N° d'enregistrement
au C.N.R.S.

A.O. 11534

THÈSE

DE DOCTORAT D'ETAT ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITE
PIERRE ET MARIE CURIE
Paris VI

par

Monsieur Michel MARTIN

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

Sujet de la Thèse : " Etude de la chromatographie en phase liquide sous pression.
Application à l'analyse des hydrocarbures aromatiques polynucléaires. "

Soutenue le 10 Juin 1975 **devant la Commission d'examen**

Président : M. G. GUIOCHON

Examinateurs : MM. F. COUSSEMANT
M. FETIZON
J.F. K. HUBER
P. PADIEU
R. ROSSET

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.

A.O. 11534

THÈSE

DE DOCTORAT D'ETAT ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITE
PIERRE ET MARIE CURIE
Paris VI

par

Monsieur Michel MARTIN

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

Sujet de la Thèse : " Etude de la chromatographie en phase liquide sous pression.
Application à l'analyse des hydrocarbures aromatiques polynucléaires. "

Soutenue le 10 Juin 1975 **devant la Commission d'examen**

Président : M. G. GUIOCHON

Examinateurs : MM. F. COUSSEMANT
M. FETIZON
J.F. K. HUBER
P. PADIEU
R. ROSSET

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

L'homme ne sait vraiment que
ce qu'il expérimente.

E. LECLERC.

Sagesse d'un pauvre

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche, parfois laborieux, mais toujours passionnant, a été pour moi source de nombreuses satisfactions. Je le dois en partie aux encouragements et aux conseils éclairés que n'a cessé de me prodiguer Monsieur le Professeur GUIOCHON qui m'a accueilli dans le Laboratoire de Chimie Analytique Physique qu'il dirige à l'Ecole Polytechnique. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je voudrais également remercier Messieurs les Professeurs COUSSEMANT (Université de Paris VI), FETIZON (Université Paris-Sud, Professeur de Chimie à l'Ecole Polytechnique), HUBER (Université de Vienne - Autriche) et PADIEU (Université de Dijon) ainsi que Monsieur ROSSET (Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de la Ville de Paris) qui ont bien voulu me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse, malgré leurs nombreuses occupations.

Je souhaite enfin remercier tous mes collègues du Laboratoire de l'Ecole Polytechnique pour l'aide qu'ils m'ont apportée, qu'il s'agisse de discussions scientifiques, d'assistance technique ou de travail matériel pour l'impression de cette thèse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548121_0042

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	13
Bibliographie - Introduction	18
CHAPITRE I : MODELE SIMPLIFIE DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE	21
I - 1. Description du modèle simplifié	22
I - 1,1. Définition des différents espaces	22
I - 1,2. Porosités	25
I - 1,3. Vitesses	25
I - 2. Equations fondamentales de la chromatographie en phase liquide	27
I - 2,1. Hydrodynamique du système chromatographique	27
I - 2,2. Caractéristiques de séjour dans la colonne	28
I - 2,3. Grandeurs liées à la forme des pics	31
I - 3. Hauteur équivalente à un plateau théorique	33
I - 3,1. Expression de H selon GIDDINGS	34
I - 3,2. Autres expressions de H	36
I - 3,3. Utilisation des variables réduites	38
I - 3,4. Résultats expérimentaux	39
I - 3,5. Remarque générale sur les équations de HEPT	44
Bibliographie - Chapitre I	47
CHAPITRE II : LIMITATIONS DU MODELE SIMPLIFIE DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE. EFFETS DE PRESSION ET DE TEMPERATURE	49
II - 1. Effet de pression	50
II - 1,1. Influence de la compressibilité des liquides	50
II - 1,2. Variation de la viscosité avec la pression	52

.../...

II - 1,3. Combinaison des effets de compressibilité et de viscosité 53

II - 1,4. Déformation de la colonne et de son garnissage sous l'effet de la pression 54

II - 1,5. Ecart à la loi de DARCY 55

II - 1,6. Effet global 55

II - 2. Effet de température 56

II - 3. Influence de ces effets sur le coefficient de distribution 60

Bibliographie - Chapitre II 62

CHAPITRE III : OPTIMISATION EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE 63

III - 1. Problème général de l'optimisation 63

III - 2. Optimisation du temps d'analyse et de la résolution 65

III - 3. Optimisation de la pression nécessaire pour obtenir une analyse déterminée 67

Bibliographie - Chapitre III 71

CHAPITRE IV : SENSIBILITE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE 73

IV - 1. Définition de quelques grandeurs liées à la réponse du détecteur 74

IV - 2. Dilution générale dans la colonne 76

IV - 3. Dilution et résolution 78

IV - 4. Dilution, résolution et temps d'analyse 80

IV - 5. Influence du volume injecté 81

Bibliographie - Chapitre IV 87

CHAPITRE V : APPAREILLAGE ET PROBLEMES ASSOCIES A L'OBTENTION D'ANALYSES PERFORMANTES 89

V - 1. Description de l'appareillage utilisé 89

.../...

V - 2. Limitations dues à l'appareillage 93

V - 2,1. Effet du volume d'échantillon 94

V - 2,2. Effet des tubes de connexion 95

V - 2,3. Effet du volume du détecteur 96

V - 2,4. Effet de la constante de temps du détecteur 97

V - 2,5. Effet de la non-linéarité de réponse du détecteur 98

V - 2,6. Effet global de l'appareillage 99

V - 3. Remplissage des colonnes 99

V - 4. Problème de l'injection dans des colonnes courtes très efficaces 101

Bibliographie - Chapitre V 105

CHAPITRE VI : ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYNUCLEAIRES 107

VI - 1. Adsorption sur gel de silice et gel d'alumine 108

VI - 1,1. Comparaison des caractéristiques de rétention sur gel d'alumine et gel de silice 108

VI - 1,2. Séparations sur gel d'alumine 109

VI - 1,3. Activité de l'adsorbant 110

VI - 1,4. Séparations sur gel de silice 111

VI - 1,5. Exemple d'application : mélange de supports 111

VI - 2. Complexation par transfert de charge 112

VI - 2,1. Utilisation du nitrate d'argent 112

VI - 2,2. Utilisation de la trinitrofluorènone 113

VI - 3. Chromatographie de partage 117

VI - 4. Chromatographie en phase liquide à haute performance 119

Bibliographie - Chapitre VI 122

CONCLUSION 123

Bibliographie - Conclusion 126

LISTE DES SYMBOLES 127

ANNEXE I

The effect of pressure on the retention time and the retention volume of an inert compound in liquid chromatography.
M. MARTIN, G. BLU, G. GUIOCHON, J. Chrom. Sci., 11, 641 (1973)

ANNEXE II

Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography
I - Theoretical analysis
M. MARTIN, C. EON, G. GUIOCHON, J. Chromatog., 99, 357 (1974)

ANNEXE III

Optimization of column design and operating parameters in high speed liquid chromatography
M. MARTIN, C. EON, G. BLU, G. GUIOCHON, J. Chrom. Sci., 12, 438 (1974).

ANNEXE IV

Role of column parameters and injection volume on detection limits in liquid chromatography.
B.L. KARGER, M. MARTIN, G. GUIOCHON, Anal. Chem., 46,1640(1974)

ANNEXE V

Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography
II - Problems in equipment design.
M. MARTIN, C. EON, G. GUIOCHON, J. Chromatog., à paraître(1975)

ANNEXE VI

Analyse par famille de mélanges industriels d'hydrocarbures aromatiques polynucléaires à l'aide de la chromatographie en phase liquide rapide.
M. MARTIN, J. LOHEAC, G. GUIOCHON, Chromatographia, 5,33(1972)

.../...

ANNEXE VII

Analyse d'hydrocarbures aromatiques polynucléaires par chromatographie en phase liquide sous pression.
J. LOHEAC, M. MARTIN, G. GUIOCHON, Analusis., 2, 168 (1973)

ANNEXE VIII

Separation of polyaromatic hydrocarbons by liquid-solid chromatography using 2,4,7 - trinitrofluorenone impregnated Corasil I columns.
B.L. KARGER, M. MARTIN, J. LOHEAC, G. GUIOCHON, Anal. Chem., 45, 496 (1973).

INTRODUCTION

Si certains auteurs ont noté que la première séparation en phase liquide était décrite dans le livre de l'Exode (1) quand Yahvé sépara les eaux de la Mer Rouge pour ouvrir la route au peuple juif et le protéger de l'armée du Pharaon, la première référence à un processus de chromatographie en phase liquide se trouve également dans l'Ancien Testament (2) où est mentionnée une certaine sorte de bois possédant des propriétés adsorptives le rendant capable d'adoucir de l'eau amère. ARISTOTE (3) savait d'ailleurs que certaines terres pouvaient purifier l'eau de mer.

Au 16ème siècle, le Strasbourgeois BRUNSCHWIG (4) purifia de l'alcool par distillation en faisant passer la vapeur à travers une éponge imprégnée d'huile d'olive, réalisant ainsi une expérience de chromatographie gaz-liquide 440 ans avant la découverte de cette technique.

Un certain nombre d'expériences scientifiques effectuées au 19ème siècle relèvent de phénomènes chromatographiques. L'isolation de l'aniline dans un distillat de brai de houille par séparation radiale sur papier et mise en oeuvre d'une méthode de détection basée sur une réaction colorée et les séparations de colorants et de pigments naturels sur bandes de papier font de RUNGE (5), SCHONBEIN (6) et GOPPELSROEDER (7) les précurseurs de la chromatographie sur papier. En constatant en 1850 une perte d'ammoniac dans des tas de fumier, le propriétaire-fermier

anglais THOMPSON (8) présuma que c'était dû aux propriétés adsorptives du sol et WAY (9), la même année, décrivit correctement le processus d'échange d'ions. A la fin du 19ème siècle, le géologue américain DAY (10) et ses collaborateurs (11) reproduisirent en laboratoire , sur une colonne remplie de calcaire, des expériences sur la séparation et le changement de coloration du pétrole en différentes zones, analogues à celles qu'ils avaient observées dans les couches supérieures de la terre.

Toutefois, ce n'est qu'au début du 20ème siècle que fut découverte la première méthode chromatographique, la chromatographie en phase liquide sur colonne par le botaniste russe TSWETT qui observa la formation de zones colorées lors de l'élution par l'éther de pétrole de pigments de chlorophylle dans une colonne en verre remplie de carbonate de calcium. TSWETT, qui donna en 1906 le nom de chromatographie à cette technique, a exactement reconnu le phénomène d'adsorption et dégagé une méthode pratique de laboratoire en reconnaissant qu'elle pouvait s'appliquer aux substances incolores autant qu'aux composés colorés (12).

A l'exception de quelques rapports décrivant des expériences par chromatographie d'adsorption, les travaux de TSWETT restèrent dans l'oubli pendant une vingtaine d'années et il fallut attendre 1931,avec la publication de KUHN, WINTERSTEIN et E. LEDERER (13) sur la séparation des carotènes et xanthophylles du jaune d'oeuf en leurs isomères,pour assister au développement de la chromatographie.

Dans les années 40, le Suédois TISELIUS et ses collaborateurs développèrent des techniques perfectionnées nécessaires à l'expansion de la chromatographie sur colonne avec les concepts et l'utilisation de développement par analyse frontale, par déplacement et par élution (14) (ce dernier mode ayant été utilisé pour la première fois en 1938 par REICHSTEIN (15)). TISELIUS (16)

fut également le premier à utiliser, en 1942, une méthode de détection en continu de l'effluent de colonne, fondée sur la mesure de l'indice de réfraction, et à employer, en 1952, la technique du gradient d'élution (17).

La chromatographie liquide-liquide sur colonne fut utilisée pour la première fois en 1941 par MARTIN et SYNGE qui établirent une théorie de la rétention en chromatographie et développèrent le concept de plateaux théoriques (18). Dans la publication qui devait leur valoir le Prix Nobel de Chimie en 1952, ils prévoyaient aussi l'utilisation de la chromatographie de partage gaz-liquide et celle de la chromatographie en phase liquide sous pression dans des lits de fines particules.

Par la suite, les développements rapides de nouvelles techniques chromatographiques (chromatographie d'échange d'ions, ADAMS et HOLMES, 1935 (19), puis COHN, 1949 (20), MOORE et STEIN, 1951 (21) - chromatographie sur papier, CONSDEN, GORDON et MARTIN, 1944 (22) - chromatographie en couches minces, IZMAILOV et SHRAIBER, 1938 (23), puis KIRCHNER, MILLER et KELLER, 1951 (24) et STAHL, 1956 (25) - chromatographie en phase gazeuse, JAMES et MARTIN, 1952 (26) - chromatographie de perméation de gel, PORATH et FLODIN, 1959 (27)), ralentirent celui de la chromatographie en phase liquide sur colonne, que la lenteur des analyses et la faible sensibilité de détection n'ont pas non plus favorisé.

Pourtant, au début des années 60, sous l'impulsion des biochimistes, des pétroliers et des utilisateurs de la chromatographie en phase gazeuse, des améliorations ont été apportées aux différents éléments d'un chromatographe en phase liquide par ceux que l'on peut appeler les "précurseurs de la chromatographie en phase liquide moderne" : percolation du liquide dans la colonne à des débits élevés grâce à l'emploi de pompes à basse

pression (28-30) ou moyenne pression (31, 32),injection directe en tête de colonne (33), utilisation de colonnes remplies de particules fines (34) et même très fines (35), mise au point de détecteurs sensibles permettant l'analyse en continu de l'effluent de colonne (36-38).

A l'exception de deux publications reçues en 1966 (39, 40), on peut fixer à 1967 les premières descriptions des appareils que l'on appelle maintenant "chromatographes en phase liquide à haute pression" (41-49).

Depuis lors, les progrès de la chromatographie en phase liquide ont été très rapides. Au 10ème Symposium International de Chromatographie qui s'est tenu du 30 Septembre au 4 Octobre 1974 à Barcelone, les communications qui lui étaient consacrées couvraient 35 % de l'ensemble des conférences.

La chromatographie en phase liquide est une méthode d'analyse pouvant être comparée à la chromatographie en phase gazeuse du point de vue rapidité et efficacité des séparations. Cette méthode devient un complément précieux et unique,dans certains cas, des autres techniques analytiques (chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie, techniques électrochimiques, ...), convenant particulièrement bien à l'analyse des composés labiles ou à poids moléculaire élevé.

Les progrès réalisés depuis la "renaissance" dans la seconde moitié des années 60 ont conduit à l'utilisation de particules constituées d'un noyau imperméable recouvert d'une mince pellicule poreuse de quelques microns d'épaisseur, puis de particules fines, de diamètre moyen inférieur à 20 microns, ainsi qu'à l'emploi de pressions d'entrée très élevées (jusqu'à 500 atmosphères). Cependant, comme on le verra plus loin, cette course effrénée vers les hautes pressions, dangereuse et coûteuse, n'est pas toujours pleine de sens.

Pour comprendre le pourquoi de l'amélioration des performances en chromatographie en phase liquide, les équations fondamentales de la chromatographie seront données dans un premier chapitre ainsi que sera décrit un modèle simplifié de représentation des différentes phases d'une colonne chromatographique. Dans un second chapitre, les limitations de ce modèle seront exposées. Elles proviennent d'une part d'un effet de pression, d'autre part d'un effet de température, qui modifient les conditions d'obtention des équations fondamentales.

La chromatographie est une technique comportant de nombreuses variables interdépendantes. Toute action sur une de ces variables entraîne en général une modification des autres, ce qui peut parfois conduire à des conclusions radicalement différentes de l'influence de tel ou tel paramètre sur les conditions opératoires. Pour clarifier ce point, on étudiera dans un troisième chapitre le problème général de l'optimisation. Les résultats seront appliqués d'une part à l'optimisation du temps d'analyse à résolution constante, d'autre part à celle de la pression nécessaire pour obtenir une analyse donnée. Les problèmes de sensibilité en chromatographie en phase liquide, liés aux conditions de fonctionnement, seront évoqués dans le quatrième chapitre. Dans le cinquième, l'appareillage sera décrit et les problèmes associés à l'obtention d'analyses performantes (remplissage des colonnes, limitation des volumes morts) exposés. Enfin, le sixième chapitre sera consacré aux applications à l'analyse des hydrocarbures aromatiques polynucléaires sur différents types de colonnes.

ooo o ooo

BIBLIOGRAPHIE - INTRODUCTION

(1) Ancien Testament, Ex, XIV, 15

(2) Ancien Testament, Ex, XV, 23

(3) ARISTOTE, Travaux, 933 b

(4) H. BRUNSCHWIG, Liber de arte distillandi (1512)

(5) F.F. RUNGE, Der Bildungstrieb der Stoffe, Oranienburg (1855)

(6) C.H. SCHONBEIN, Poggendorf's Annalen, 42, 222 (1837)

(7) F. GOPPELSROEDER, Verhandl. Naturforsch. Ges. Basel, 1901,14 (1901)

(8) H.S. THOMPSON, J. Roy. Agr. Soc. England, 11, 68 (1850)

(9) J.T. WAY, J. Roy. Agr. Soc. England, 11, 313 (1850)

(10) D.T. DAY, Proc. Amer. Phil. Soc., 36(154), 112 (1897)

(11) C. ENGLER, E. ALBRECHT, Z. Angew. Chem., 36, 889 (1901)

(12) M. TSWETT, Ber. Deut. Bot. Ges., 24, 313 (1906)

(13) R. KUHN, A. WINTERSTEIN, E. LEDERER, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 197, 141 (1931).

(14) A. TISELIUS, Koll. Z., 105,(1943) 101

(15) T. REICHSTEIN, J. VAN EUW, Helv. Chim. Acta., 21, 1197 (1938)

(16) A. TISELIUS, S. CLAESSON, Arkiv. Kemi, Mineral. Geol., 15B, N°18, (1942)

(17) R.S. ALM, R.J.P WILLIAMS, A. TISELIUS, Acta Chem. Scand., 6, 826 (1952)

(18) A.J.P. MARTIN, R.L.M. SYNGE, Biochem. J., 35, 1358 (1941)

(19) B.A. ADAMS, E.L. HOLMES, J. Soc. Chem. Ind., 54, 1T (1935)

(20) W.E. COHN, Science, 109, 377 (1949)

(21) S. MOORE, W.H. STEIN, J. Biol. Chem., 192, 663 (1951)

.../...

(22) R. CONSDEN, A.H. GORDON , A.J.P. MARTIN, Biochem.J., 38, 224 (1944)

(23) N.A. IZMAILOV, M.S. SHRAIBER, Farmatsiya, 3, 1 (1938)

(24) J.G. KIRCHNER, J.M. MILLER, G.J. KELLER, Anal. Chem., 23, 420 (1951)

(25) E. STAHL, Pharmazie, 11, 633 (1956)

(26) A.T. JAMES, A.J.P. MARTIN, Biochem. J., 50, 679 (1952)

(27) J. PORATH, P. FLODIN, Nature, 183, 1657 (1959)

(28) N.G. ANDERSON, J.G. GREEN, M.L. BARBER, F.C. LADD, Anal. Biochem, 6, 153 (1963)

(29) C.KARR, E.E. CHILDERS, W.C. WARNER, Anal. Chem. ,35, 1290 (1963)

(30) S.M. LAMBERT, P.E. PORTER, Anal. Chem., 36, 99 (1964)

(31) P. HAMILTON, Anal. Chem., 32, 1779 (1960)

(32) R.E. JENTOFT, T.H. GOUW, Anal. Chem., 38, 949 (1966)

(33) J.F.K. HUBER, G. VAN VUGHT, Ber. Bunsen Ges . phys. Chem., 69, 821 (1965).

(34) J.V. BENSON, J.A. PATTERSON, Anal. Chem., 37, 1108 (1965)

(35) E.V. PIEL, Anal. Chem., 38, 670 (1966)

(36) K.J. BOMBAUGH, J.N. LITTLE, J. Chromatog. 16, 47 (1964)

(37) E. HAAHTI, T. NIKKARI, J. KARKKAINEN, Gas Chromatography, Brighton 1964, ed. A. Goldup, The Institute of Petroleum, London (1965), 190

(38) A.T. JAMES, J.R. RAVENHILL, R.P. W. SCOTT, id., 197

(39) C.G. HORVATH, S.R. LIPSKY, Nature, 211, 748 (1966)

(40) J.F.K. HUBER, J.A.R.J. HULSMAN, Anal. Chim. Acta, 38, 305 (1967)

(41) T.W. SMUTS, F.A. VAN NIEKERK, V. PRETORIUS, J. Gas Chrom., 5, 190 (1967)

(42) D.C. LOCKE, J. Gas Chromatog., 5, 203 (1967)

.../...

(43) L.R.SNYDER, Anal. Chem, 39, 698 (1967)

(44) R.P.W.SCOTT, D.W.J. BLACKBURN, T. WILKINS, J. Gas Chrom, 5, 183 (1967)

(45) C.D. SCOTT, J.E. ATTRILL, N.G. ANDERSON, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125, 181 (1967)

(46) C.G. HORVATH, B.A. PREISS, S.R. LIPSKY, Anal. Chem., 39, 1422 (1967)

(47) I.HALASZ, A. KRONEISEN, H.O. GERLACH, P. WALKLING, Z. Anal. Chem., 234, 81 (1968)

(48) J.J. KIRKLAND, Anal. Chem. 40, 391 (1968)

(49) R.E. JENTOFT, T.H. GOUW, Anal. Chem, 40, 923 (1968)

ooo o ooo

CHAPITRE I

MODELE SIMPLIFIE DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

Dans une colonne chromatograhique remplie de particules de forme quasiment sphérique ou irrégulière, on peut distinguer plusieurs espaces : celui où se fait la circulation du fluide et que l'on appelle intergranulaire (on considère en effet qu'aucune circulation ne se produit à l'intérieur des particules habituellement utilisées en chromatographie en phase liquide, la dimension des pores dans les grains étant très faible par rapport à celle des grains), l'espace occupé par le solide lui-même (cet espace est inaccessible aux molécules des solutés comme à celles du fluide vecteur), enfin l'espace intragranulaire occupé par ce fluide vecteur, dans les pores internes des grains, que l'on appellera phase stagnante par opposition au fluide de même nature en mouvement dans l'espace intergranulaire. Eventuellement, dans le cas de la chromatographie de partage, on distinguera un quatrième espace, occupé par une phase liquide stationnaire au contact du solide à l'intérieur des grains : cet espace pourra être accessible à certains solutés.

Un tel système chromatographique possède une géométrie très complexe qu'il est impossible d'exprimer mathématiquement. Toutefois, à l'aide d'un modèle simple, il devient possible de représenter physiquement le système et d'en déduire quelques équations sur l'hydrodynamique, qui, avec celles exprimant des notions de plateaux théoriques, de hauteur équivalente à un plateau théorique et de résolution, formeront les équations fondamentales de la chromatographie.

.../...

I - 1. DESCRIPTION DU MODELE SIMPLIFIE

I - 1,1. Définition des différents espaces

Le modèle est représenté sur la figure 1 (page suivante). On y distingue plusieurs zones correspondant aux différents espaces :

a) L'espace occupé par le solide, il occupe un volume V_S dans la colonne. Ce volume est égal à :

$$V_S = \frac{m_s}{d_s} \qquad \text{I-1}$$

m_s étant la masse de support contenu dans la colonne, d_s sa densité vraie (différente de la densité apparente qui tient compte de l'espace intragranulaire et de la densité de remplissage qui tient compte en plus de l'espace intergranulaire) pouvant être déterminée par mesure picnométrique.

b) L'espace correspondant au volume V_ℓ éventuellement occupé par la phase liquide stationnaire en chromatographie liquide-liquide. Ce volume est égal à :

$$V_\ell = \frac{m_\ell}{d_\ell} \qquad \text{I -2}$$

m_ℓ étant la masse de liquide stationnaire de densité d_ℓ déposé. Dans le modèle, ce liquide est supposé uniformément réparti sur la surface du solide.

c) L'espace intragranulaire rempli par le liquide vecteur stagnant dans les pores internes du solide. Son volume V_i

.../...

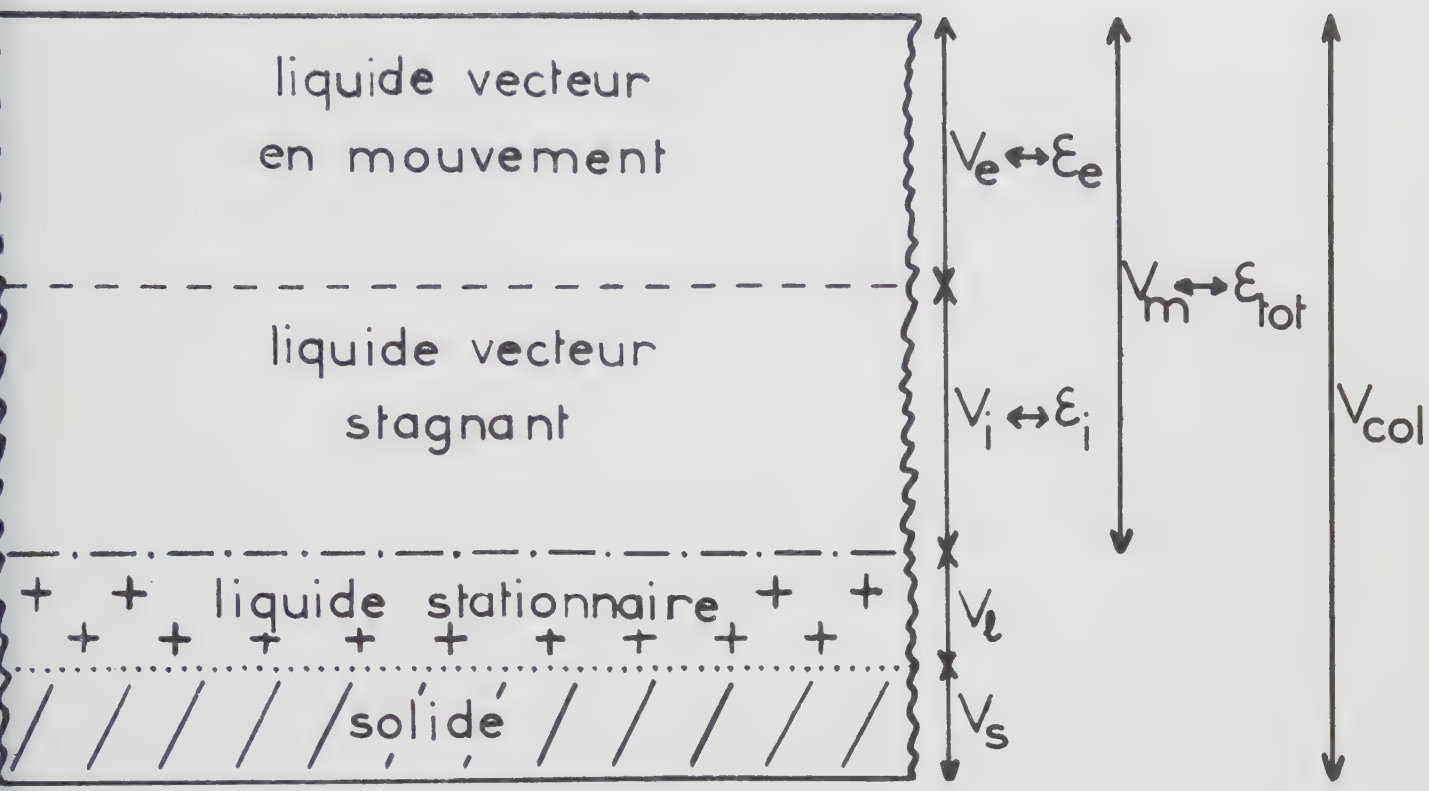


FIGURE 1

Modèle simplifié de chromatographie.

Représentation schématique de la colonne.

peut être exprimé par :

$$V_i = V_p\, m_s - V_\ell \qquad \text{I-3}$$

V_p étant le "volume poreux" parfois spécifié par les fabricants de remplissages chromatographiques, il représente le volume occupé par les pores internes d'un gramme de solide.
V_i peut être nul lorsque les particules sont imperméables (billes de verre par exemple) ou totalement imprégnées de la phase liquide stationnaire. Ce volume devient maximal, pour un remplissage donné, dans le cas de la chromatographie d'adsorption.

On supposera qu'en l'absence de circulation du liquide vecteur, la concentration à l'équilibre d'un soluté dans cette phase sera la même que celle du soluté dans l'espace intergranulaire.

Remarques : 1. Le cas de la chromatographie d'échange d'ions n'est pas traité ici. Le liquide vecteur étant rarement pur, on a souvent, à cause des forces électriques mises en jeu par la présence des sites échangeurs d'ions, une modification de composition du liquide contenu dans l'espace intragranulaire rendant inaccessible cet espace à certains ions ou molécules.

2. Le cas de la chromatographie d'exclusion ne sera pas traité non plus puisque, à cause de la dimension réduite de certains pores, une fraction de l'espace intragranulaire est inaccessible à certaines molécules, d'où une concentration différente en soluté entre cet espace et l'espace intergranulaire.

d) L'espace intergranulaire où se produit effectivement la circulation du liquide vecteur lorsqu'une différence de pression est appliquée entre l'entrée et la sortie de la colonne.

.../...

Son volume V_e est alors :

$$V_e = \frac{\pi}{4} d_c^2 L - (V_S + V_\ell + V_i) \qquad \text{I-4}$$

d_c étant le diamètre intérieur de la colonne de longueur L et de section S.

I - 1,2. Porosités

A ces différents volumes correspondent des fractions volumiques qui sont leurs rapports au volume total de la colonne :

$$V_{col} = \frac{\pi d_c^2}{4} L \qquad \text{I-5}$$

On définit en particulier :

- la porosité interne :

$$\varepsilon_i = \frac{V_i}{V_{col}} \qquad \text{I-6}$$

encore appelée porosité intragranulaire (ou intraparticulaire),

- la porosité externe :

$$\varepsilon_e = \frac{V_e}{V_{col}} \qquad \text{I-7}$$

également dénommée porosité intergranulaire (ou extragranulaire).

Dans ces conditions, la porosité totale :

$$\varepsilon_{tot} = \varepsilon_e + \varepsilon_i \qquad \text{I-8}$$

est la fraction du volume de colonne occupé par le liquide vecteur.

Les valeurs expérimentales de ε_e sont comprises entre 0,33 et 0,37 et pratiquement indépendantes du diamètre moyen des particules. Si ε_e est plus grand que 0,37 ,la colonne est insuffisamment tassée, ce qui nuit à son efficacité. Les valeurs inférieures à 0,33 correspondent à des supports de granulométrie trop largement répartie ou à des particules plastiques que la compression déforme, réduisant ainsi le vide extraparticulaire. ε_e peut être déterminé expérimentalement par porosimétrie au mercure ou dérivé des mesures de perméabilité.
Selon les dimensions des pores internes et le volume de phase liquide stationnaire éventuellement déposée, ε_{tot} varie entre 0,33 (valeur minimale de ε_e) et 0,85 à 0,90 pour un support très poreux comme le gel de silice ou le gel d'alumine.

I - 1,3. Vitesses

De l'existence des différents espaces ci-dessus définis résultent des ambiguïtés sur la "vitesse du fluide vecteur". Par souci de clarification, si Q est le débit du liquide vecteur, pouvant être mesuré sans ambiguïté à la sortie de la colonne, on définit :

- la vitesse en fût vide, v , qui serait la vitesse moyenne que l'on obtiendrait si la colonne n'était pas remplie :

$$v = \frac{4\,Q}{\pi\, d_c^2} \qquad \text{I-9}$$

- la vitesse superficielle $\bar{v}$ est la vitesse moyenne vraie du liquide vecteur dans la section offerte à l'écoulement, $\varepsilon_e S$:

$$\bar{v} = \frac{4\,Q}{\pi\, \varepsilon_e d_c^2} \qquad \text{I-10}$$

- la vitesse de filtration ou vitesse moyenne de transit d'une molécule de liquide vecteur (ou de soluté non-retenu), u, est plus faible que cette dernière puisque cette molécule pénètre dans l'espace intragranulaire où la vitesse est nulle. Elle sera donc égale au débit divisé par l'aire de la section droite moyenne occupée par le fluide vecteur, $(\varepsilon_e + \varepsilon_i)$ S :

$$u = \frac{4\,Q}{\pi(\varepsilon_e+\varepsilon_i)\,d_c^2} = \frac{4\,Q}{\pi\varepsilon_{tot}d_c^2} \qquad \text{I-11}$$

Bien entendu, ces différentes vitesses ne sont pas indépendantes. On passe aisément de l'une à l'autre par les relations suivantes :

$$u = \bar{v}\,\frac{\varepsilon_e}{\varepsilon_{tot}} = \frac{v}{\varepsilon_{tot}} \qquad \text{I-12}$$

I - 2. EQUATIONS FONDAMENTALES DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

Les équations qui vont être exposées ci-dessous peuvent être qualifiées de "fondamentales" dans la mesure où elles permettront de prévoir l'action d'un paramètre opératoire sur les autres variables de fonctionnement, ainsi que sur le comportement des zones de soluté dans la colonne. Elles peuvent être classées en différents groupes selon qu'elles se rapportent à l'hydrodynamique du système, aux caractéristiques de séjour dans la colonne ou à la forme des pics.

I - 2,1. Hydrodynamique du système chromatographique

L'apparition d'une vitesse de percolation dans un milieu poreux est liée à l'existence d'un gradient de pression local dP/dx d'après la relation de DARCY (1) :

$$v = -\frac{k}{\eta}\,\frac{dP}{dx} \qquad \text{I-13}$$

k étant la perméabilité de la colonne, η la viscosité du liquide. Si l'on admet que le liquide est incompressible et les coefficients k et η constants, le gradient de pression est constant tout au long de la colonne et l'on a :

$$v = \frac{k}{\eta} \frac{\Delta P}{L} \qquad \text{I-14}$$

où ΔP est la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne.
L'équation de BLAKE-KOZENY (2, 3) exprime la perméabilité en fonction du diamètre moyen des particules, d_p, et de la porosité externe :

$$k = \frac{d_p^2 \ \varepsilon_e^3}{150 \ (1-\varepsilon_e)^2} \qquad \text{I-15}$$

Les équations I-12, I-14 et I-15 peuvent être combinées pour relier le gradient de pression à la vitesse de filtration :

$$u = \frac{k_o \ d_p^2}{\eta} \frac{\Delta P}{L} \qquad \text{I-16}$$

avec :

$$k_o = \frac{1}{150} \frac{\varepsilon_e^3}{(1-\varepsilon_e)^2} \frac{1}{\varepsilon_{tot}} \qquad \text{I-17}$$

I - 2,2. Caractéristiques de séjour dans la colonne

Le temps de séjour moyen, t_m, d'une molécule de liquide vecteur (ou de soluté inerte) ayant une vitesse moyenne de transit u dans la colonne de longueur L sera bien entendu en chromatographie d'élution :

$$t_m = \frac{L}{u} \qquad \text{I-18}$$

.../...

Si t_R est le temps de séjour moyen d'une molécule d'un composé retenu, on définit le facteur de capacité k' de ce composé par le rapport :

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m} \qquad \text{I-19}$$

t_R, appelé temps de rétention du composé, est alors égal à :

$$t_R = \frac{L}{u} (1 + k') \qquad \text{I-20}$$

Ce composé migre dans la colonne avec une vitesse moyenne u' telle que :

$$u' = R\,u = \frac{L}{t_R} \qquad \text{I-21}$$

Le facteur R est lié à k' par :

$$R = \frac{1}{1 + k'} \qquad \text{I-22}$$

On peut montrer (4) que ce facteur R possède plusieurs significations. Outre qu'il représente le taux de migration relatif du soluté par rapport au liquide vecteur, c'est également la fraction du temps passé par une molécule de soluté en phase mobile, ainsi que la probabilité d'une molécule de soluté de se trouver dans cette phase. Enfin, si le nombre de molécules de soluté injecté dans la colonne est suffisamment grand, R est, à l'équilibre, la fraction de ce nombre de molécules situées en phase mobile.

Le volume mort d'une colonne est le volume qui s'écoule en sortie de colonne pendant le temps moyen de transit d'un composé

.../...

inerte, soit :

$$V_m = \Omega\ t_m \qquad \text{I-23}$$

D'après les équations I-11, I-18 et I-23, ce volume est aussi :

$$V_m = \varepsilon_{tot}\ V_{col} \qquad \text{I-24}$$

soit le volume occupé par le liquide vecteur dans la colonne.
Le volume de rétention d'un soluté est le volume écoulé en sortie de colonne pendant le temps de rétention :

$$V_R = \Omega\ t_R = V_m\ (1 + k') \qquad \text{I-25}$$

Ce volume de rétention est relié à la constante d'équilibre de partage K en chromatographie liquide-liquide par l'équation fondamentale suivante (5) :

$$V_R = V_m + K\ V_\ell \qquad \text{I-26}$$

Une équation similaire peut être obtenue en chromatographie d'adsorption :

$$V_R = V_m + K\ A_S \qquad \text{I-27}$$

A_S étant l'aire de la surface du solide en contact avec le liquide; K ,la constante d'équilibre d'adsorption.
Il en résulte pour k' l'expression suivante :

$$k' = K \frac{V_\ell}{V_m} \quad \text{ou} \quad k' = K \frac{A_S}{V_m} \qquad \text{I-28}$$

selon le cas, K étant la constante thermodynamique de distribution du soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Remarques : 1. Dans ce qui précède, k' et par conséquent K sont considérés comme des constantes pour un soluté. On sait

que K varie avec la concentration du soluté en phase mobile. Supposer que K est constant et égal à la pente à l'origine de l'isotherme de distribution implique que la concentration du soluté dans la phase mobile est suffisamment faible pour être située dans la partie linéaire de cet isotherme.

2. Pouvoir définir un temps de rétention d'un soluté suppose que le temps pendant lequel celui-ci est injecté dans la colonne est très petit comparé au temps de séjour moyen d'une molécule de soluté.

3. Ces deux conditions constituent le cadre dans lequel se situe ce que l'on peut appeler la "chromatographie d'élution linéaire" qui est approximativement le domaine de la chromatographie analytique.

I - 2,3. Grandeurs liées à la forme des pics

Dans les conditions définies ci-dessus, une zone de soluté aura en sortie de colonne une certaine largeur et l'on pourra caractériser la variance σ^2 de cette zone. On peut montrer (6) que si la longueur de la colonne est suffisamment grande, la forme de cette zone, parfois appelée "pic chromatographique", est analogue à celle d'une courbe de Gauss (courbe en "cloche") pour laquelle le maximum correspond au temps de rétention du soluté. La variance totale est la somme des variances des phénomènes indépendants provoquant un élargissement du pic. Ces phénomènes peuvent être divisés en deux parties : ceux liés à la colonne et ceux liés au passage du soluté dans des zones externes à la colonne, de l'injection à la détection, les contributions à la variance totale, σ^2_{tot}, étant respectivement σ^2_{col} et σ^2_{ext} :

$$\sigma^2_{tot} = \sigma^2_{col} + \sigma^2_{ext} \qquad \text{I-29}$$

On cherchera toujours à obtenir la condition : $\sigma^2_{ext} << \sigma^2_{col}$.

.../...

Dans ce qui suit, sauf indication contraire où précisément cette condition sera testée, on la supposera réalisée et on emploiera seulement le terme σ^2 pour désigner σ^2_{tot} ou σ^2_{col}.

On définit le nombre de plateaux théoriques N par le rapport :

$$N = \frac{V_R^2}{\sigma_V^2} \qquad \text{I-30}$$

ou

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma_t^2} \qquad \text{I-31}$$

selon que σ est exprimé en unité de volume ou de temps, respectivement. Bien entendu, on a la relation :

$$\sigma_V = Q\ \sigma_t \qquad \text{I-32}$$

Par analogie à la théorie de la distillation, on peut également définir la hauteur équivalente à un plateau théorique H (5) :

$$H = \frac{L}{N} \qquad \text{I-33}$$

qui représente l'accroissement de la variance par unité de longueur de colonne :

$$H = \frac{\sigma_L^2}{L} \qquad \text{I-34}$$

σ_L étant l'écart-type de la zone, exprimé en unité de longueur de colonne. H est un paramètre très important. La détermination de son expression en fonction des conditions opératoires sera l'objet du prochain paragraphe.

La chromatographie est avant tout une méthode de séparation. On peut exprimer la qualité de la séparation de deux produits 1 et 2

.../...

par une grandeur appelée résolution, R_S , définie comme le rapport :

$$R_S = \frac{V_{R_2} - V_{R_1}}{2\sigma_{V,1} + 2\sigma_{V,2}} \qquad \text{I-35}$$

V_{R_1} et V_{R_2} étant les volumes de rétention des deux produits d'écarts-types respectifs $\sigma_{V,1}$ et $\sigma_{V,2}$. Si l'on suppose que : $\sigma_{V,1} = \sigma_{V,2}$, alors on peut écrire :

$$R_S = \frac{\sqrt{N_2}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_2}{1 + k'_2} \qquad \text{I-36}$$

α étant le facteur de sélectivité du système pour les deux produits, défini comme le rapport :

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1} \qquad \text{I-37}$$

La largeur de la zone de soluté augmentant au cours du transit dans la colonne, celui-ci se trouve de plus en plus dilué. Si m est la masse de soluté injecté, la concentration au maximum du pic en sortie de colonne sera donnée par (7) :

$$C_{max} = \frac{m\sqrt{N}}{V_R\sqrt{2\pi}} \qquad \text{I-38}$$

I - 3. HAUTEUR EQUIVALENTE A UN PLATEAU THEORIQUE (HEPT)

Bien que leur signification physique soit très discutable, les quantités N et H sont les paramètres les plus utiles pour caractériser l'élargissement des zones et l'efficacité d'un système chromatographique.

.../...

Toutes les molécules du soluté, que l'on peut considérer comme injectées simultanément en une bande très fine dans la colonne chromatographique, ne vont pas en sortir au même instant car elles auront parcouru des chemins différents à des vitesses différentes : c'est là l'origine de l'élargissement des zones dans la colonne. Il est dû à trois principaux phénomènes :

1. la diffusion longitudinale,
2. les résistances aux transferts de masse entre les phases,
3. les inégalités de vitesse dans la phase mobile.

Ces processus étant indépendants, à cause de l'additivité des variances, leurs contributions individuelles à H s'ajoutent. On pourra donc écrire :

$$H = H_D + H_R + H_M \qquad \text{I-39}$$

H_D, H_R et H_M étant les contributions respectives des phénomènes 1, 2 et 3. Une expression détaillée de ces termes est donnée par GIDDINGS (4).

I - 3,1. Expression de H selon GIDDINGS

La diffusion longitudinale est due à la diffusion moléculaire dans la phase mobile (la diffusion longitudinale dans la phase stationnaire est négligeable). L'équation d'EINSTEIN pour la diffusion permet d'écrire :

$$H_D = \frac{2 \gamma D_m}{u} = \frac{B}{u} \qquad \text{I-40}$$

D_m est le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile, γ un facteur d'obstruction dû à la structure de l'espace intergranulaire.

La vitesse de transfert des molécules de soluté entre le liquide vecteur et la phase stationnaire est finie, ce qui provoque un retard à l'établissement de l'équilibre entre ces deux phases et, par conséquent, un élargissement de la zone du soluté. Cette vi-

.../...

tesse est controlée par la diffusion dans la phase stationnaire en chromatographie de partage ou bien par la cinétique d'adsorption-désorption en chromatographie d'adsorption. La contribution correspondante H_S à H_R peut être déterminée d'après le modèle du cheminement aléatoire unidimensionnel ou par la théorie du non-équilibre (4) :

$$H_S = q \frac{k'}{(1 + k')^2} \frac{d^2}{D_S} u = C_S u \qquad \text{dans le cas du partage,} \qquad \text{I-41}$$

ou

$$H_S = 2 \frac{k'}{(1 + k')^2} t_d u = C_S u \qquad \text{dans le cas de l'adsorption} \qquad \text{I-42}$$

d est une distance caractéristique liée à l'épaisseur du liquide stationnaire, q un facteur de configuration de cette phase, valant 2/3 pour un film liquide uniformément réparti sur la surface du solide, D_S le coefficient de diffusion du soluté dans la phase stationnaire, t_d le temps de désorption moyen.
Le second terme de résistance au transfert de masse entre phases provient du liquide vecteur stagnant dans les pores. Sa cinétique sera contrôlée par la diffusion dans cette phase, d'où la contribution H_{SM} à H_R :

$$H_{SM} = \frac{1}{30} \frac{(1 - \emptyset + k')^2}{(1 - \emptyset)(1 + k')^2} \frac{d_p^2}{\gamma_{SM} D_m} u = C_{SM} u \qquad \text{I-43}$$

avec $\emptyset = \varepsilon_i / \varepsilon_e$, γ_{SM} étant le facteur de tortuosité à l'intérieur de la particule.
On a donc par conséquent :

$$H_R = H_S + H_{SM} = (C_S + C_{SM}) u \qquad \text{I-44}$$

Dans le réseau très complexe des canaux interconnectés de l'espace intergranulaire, des inégalités de vitesse apparaissent d'un canal à l'autre à cause de leur configuration entre les particules. De

.../...

plus, dans un même canal, des variations de vitesse existent entre différents filets de liquide (par un phénomène analogue à celui qui provoque le profil de POISEUILLE dans un tube vide). Il en résulte qu'on pourra distinguer deux contributions à H_M, l'une étant liée à la relaxation de ces inégalités de vitesse par convection (H_{MC}), l'autre par diffusion (H_{MD}) :

$$H_{MC} = 2 \lambda d_p = A_{MC} \qquad \text{I-45}$$

$$H_{MD} = \frac{\omega d_p^2}{D_M} u = C_{MD} u \qquad \text{I-46}$$

λ et ω étant des facteurs de correction sans dimension.
Toutefois, ces deux termes ne correspondent pas à des phénomènes indépendants. Il en résulte ce qu'on appelle le couplage entre les effets convectif et diffusif (4). H_M s'écrit alors :

$$H_M = \frac{1}{\frac{1}{H_{MC}} + \frac{1}{H_{MD}}} = \frac{1}{\frac{1}{A_{MC}} + \frac{1}{C_{MD} u}} \qquad \text{I-47}$$

L'expression générale de H sera donc :

$$H = H_D + H_M + H_R = \frac{B}{u} + \frac{1}{\frac{1}{A_{MC}} + \frac{1}{C_{MD} u}} + (C_S + C_{SM}) u \qquad \text{I-48}$$

I - 3,2. Autres expressions de H

Par une approche tout à fait différente, HUBER (8) obtient une expression générale de H composée de quatre termes : deux représentent des termes de mélange (diffusion longitudinale, H_{M_d}, et inégalités de vitesse dans la phase mobile, H_{M_c}), les deux autres des termes d'échange de matière (dans le liquide vecteur en mouvement, H_{E_f}, et dans les particules, H_{E_b}). Ces termes s'écrivent :

.../...

$$
\begin{aligned}
H &= H_{M_d} + H_{M_c} + H_{E_f} + H_{E_b} \\
H_{M_d} &= 2\,\chi\,\frac{D_m}{\bar{v}} \\
H_{M_c} &= 2\,\frac{\lambda_1 d_p}{1+\lambda_2\sqrt{\frac{D_m}{\bar{v}\,d_p}}} \\
H_{E_f} &= \frac{1}{3}\,\psi_f\,\frac{\varepsilon_e}{1-\varepsilon_e}\,\frac{d_p^{3/2}\,\eta^{1/6}\sqrt{\bar{v}}}{\rho^{1/6}\,D_m^{2/3}}\left(\frac{k^*}{1+k^*}\right)^2 \\
H_{E_b} &= \frac{1}{30}\,\psi_b\,\frac{d_p^2\,\bar{v}}{D_p}\,\frac{k^*}{(1+k^*)^2}
\end{aligned}
\qquad \text{I-49}
$$

χ est un facteur de tortuosité de l'espace intergranulaire, λ_1 et λ_2 des facteurs sans dimension tenant compte de la géométrie de cet espace en ce qui concerne les inégalités de vitesses (ils sont déterminés par analyse dimensionnelle des données expérimentales), ψ_f et ψ_b sont également des facteurs sans dimension caractérisant respectivement la géométrie de l'espace entre les particules et de l'espace occupé par celles-ci (ils sont de l'ordre de grandeur de 1), ρ est la masse volumique de la phase mobile, D_p le coefficient de diffusion effectif du soluté dans le grain considéré comme homogène. k^* est relié à k' par :

$$1 + k^* = \frac{\varepsilon_{tot}}{\varepsilon_e}\,(1 + k') \qquad \text{I-50}$$

.../...

Utilisant une terminologie différente et partant des résultats de GLUECKAUF (9) et de VAN DEEMTER, ZUIDERWEG et KLINKENBERG (10), HAMILTON, BOGUE et ANDERSON (11) proposent une expression de H comprenant un terme de dispersion axiale due aux irrégularités du flot de liquide, analogue au terme H_{MC} (équation I-45), un terme de résistance au transfert de masse dans la particule comparable à H_S (équation I-41), enfin un terme de résistance au transfert de masse dans le liquide en mouvement, analogue à H_{MD} (équation I-46), mais comprenant une fonction non explicitée des nombres de PECLET ($Pe = \bar{v}\, d_p/D_m$) et de SCHMIDT ($Sc = \eta/\rho D_m$), ces trois termes étant additifs.

Des expressions empiriques simples ont été utilisées pour rendre compte de la forme des courbes de variation H(u) dans un domaine limité de vitesse, forme soit linéaire (12,13), soit infléchie sur l'axe des abscisses (14), les équations correspondantes étant :

$$H = A + Cu \qquad \text{I-51}$$

$$H = Du^n \qquad \text{avec } 0{,}2 < n < 0{,}6 \qquad \text{I-52}$$

I - 3,3. Utilisation des variables réduites

Dans le but de comparer les performances de systèmes chromatographiques très variés, il a été proposé d'utiliser les variables réduites suivantes (15) :

$$h = \frac{H}{d_p} \qquad \text{I-53}$$

$$\nu = \frac{u\, d_p}{D_m} \qquad \text{I-54}$$

h est la hauteur équivalente à un plateau théorique réduite. ν, la vitesse réduite, est proportionnelle au nombre de PECLET ; c'est une indication de l'importance relative de la diffusion et de la convection dans le mouvement des molécules.

.../...

A partir de nombreux résultats expérimentaux, KNOX (16) a proposé l'équation $h(\nu)$ suivante :

$$h = \frac{2\gamma}{\nu} + A\nu^{0,33} + C\nu \qquad \text{I-55}$$

γ , A et C sont des coefficients dépendant du système utilisé.
En coordonnées réelles, cette équation devient :

$$H = \frac{2\gamma D_m}{u} + \frac{A}{D_m^{1/3}} d_p^{4/3} u^{1/3} + \frac{C d_p^2}{D_m} u \qquad \text{I-56}$$

I - 3,4. Résultats expérimentaux

La connaissance de la courbe $H(u)$ est particulièrement importante. Cette courbe,connue sous le nom de courbe de VAN DEEMTER ou de HEPT, a l'allure générale présentée sur la figure 2. Toutefois, obtenir expérimentalement un tel tracé nécessite de faire varier la vitesse, et par conséquent la pression, dans un domaine très large. C'est pourquoi les courbes généralement obtenues ne reflètent qu'une partie de la courbe globale.

Aux grandes vitesses réduites, le terme B/u de l'équation I-48 est négligeable ; le terme $1/C_{MD}u$ est petit devant $1/A_{MC}$. L'équation I-48 se réduit alors à la forme linéaire représentée par l'équation I-51. Un tel exemple de courbe est montré sur la figure 3. Aux vitesses réduites moyennes, c'est le terme de couplage H_M qui devient prédominant. La figure 4 montre la forme de la courbe $H(u)$ obtenue dans ce cas et explique que certains auteurs aient proposé l'équation I-52 pour la représenter.
Enfin, aux faibles vitesses réduites, le minimum est alors clairement visible comme le montre la figure 5. Une équation globale comme l'équation I-56 est alors nécessaire pour représenter la variation de H avec u.

.../...

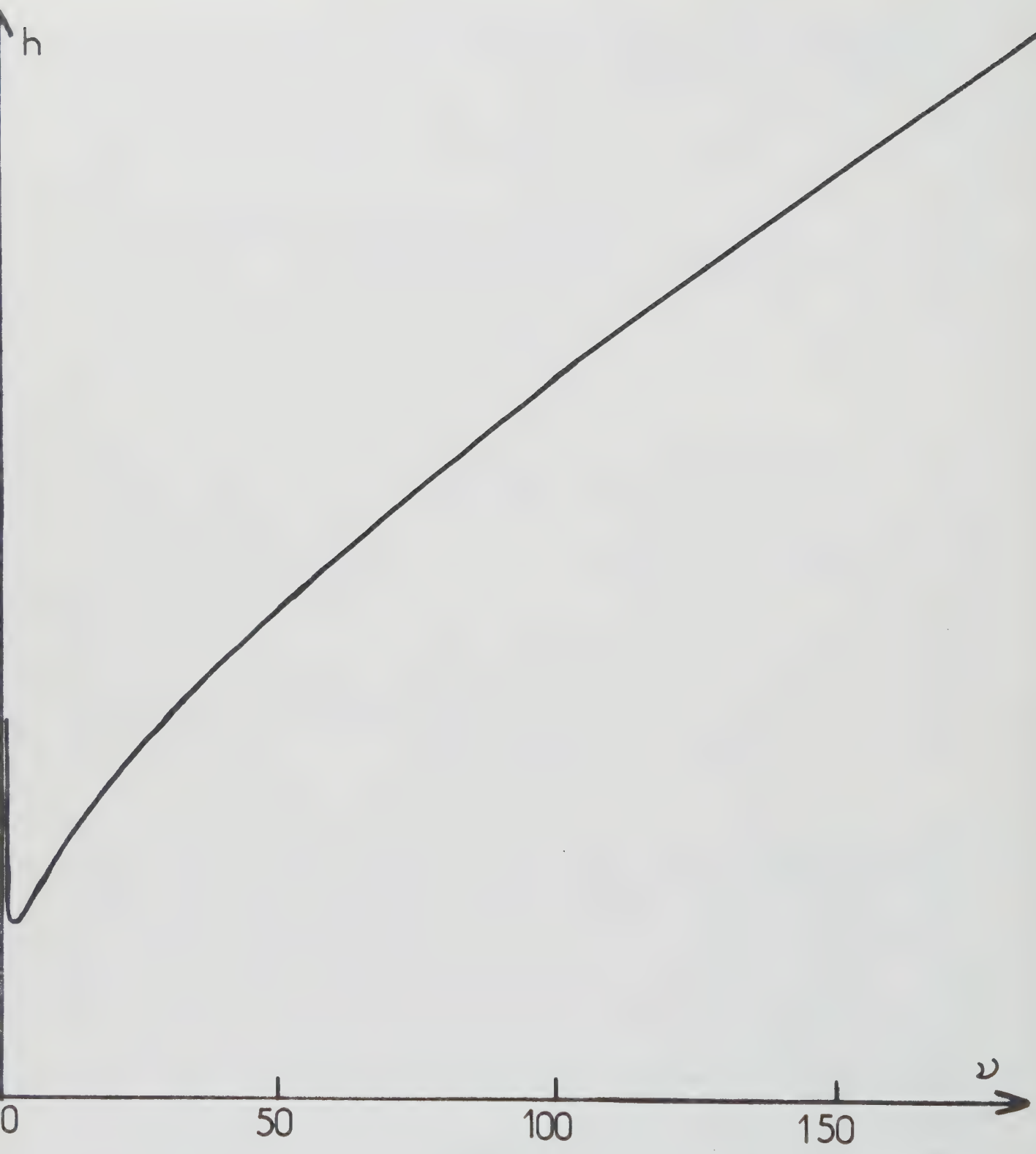


FIGURE 2

Forme générale de la courbe de HEPT

Représentation graphique de l'équation I-55 : $\gamma = 0,9$; $A = 1,7$; $C = 5 \times 10^{-2}$.

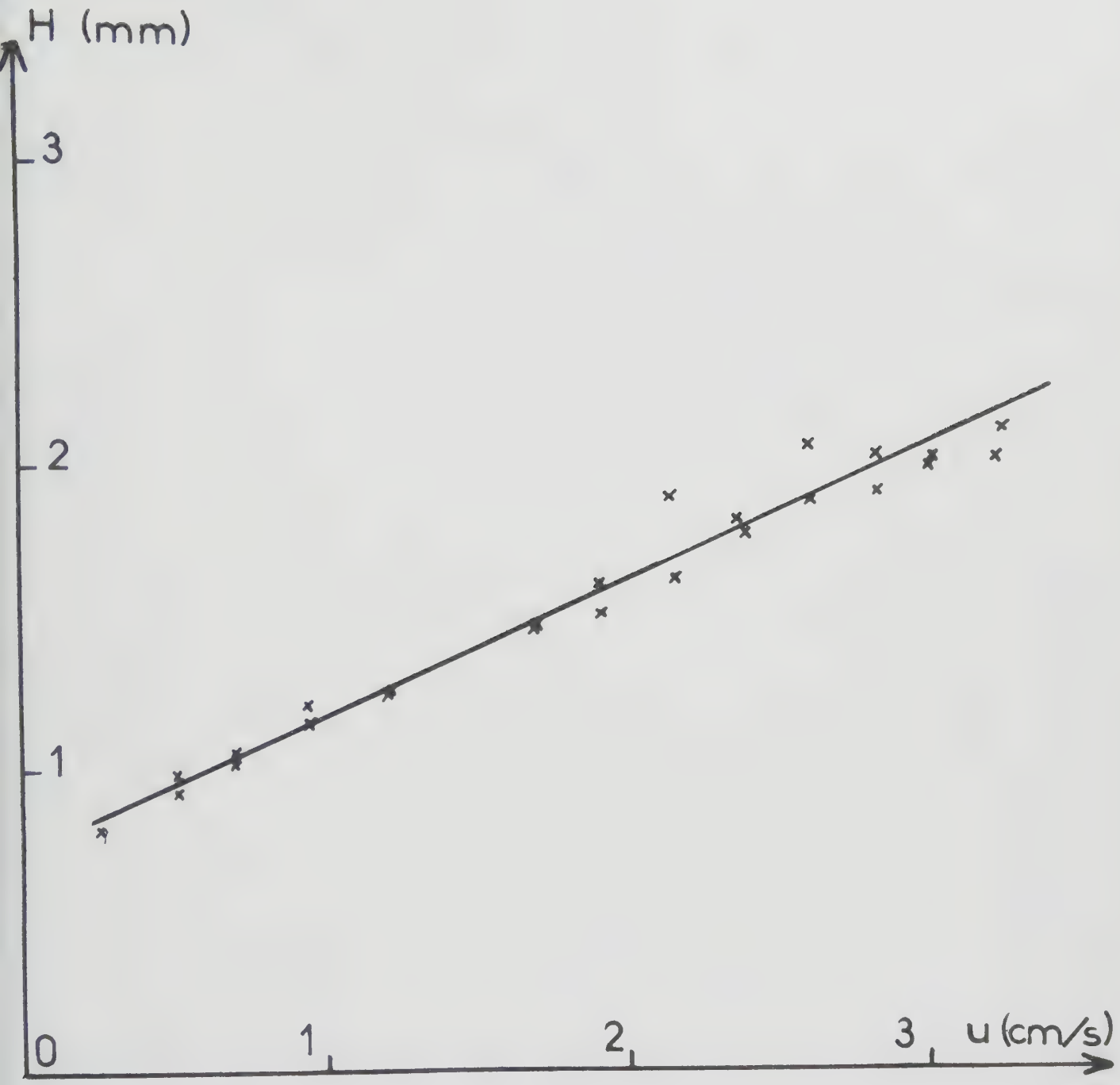


FIGURE 3

Courbe de HEPT pouvant être représentée par l'équation I-52

Colonne : 2 m x 2,1 mm
Adsorbant : Alumine neutre Woelm 50-63 µm
Liquide vecteur : n-heptane
Soluté : benzène
T = 91,5°C

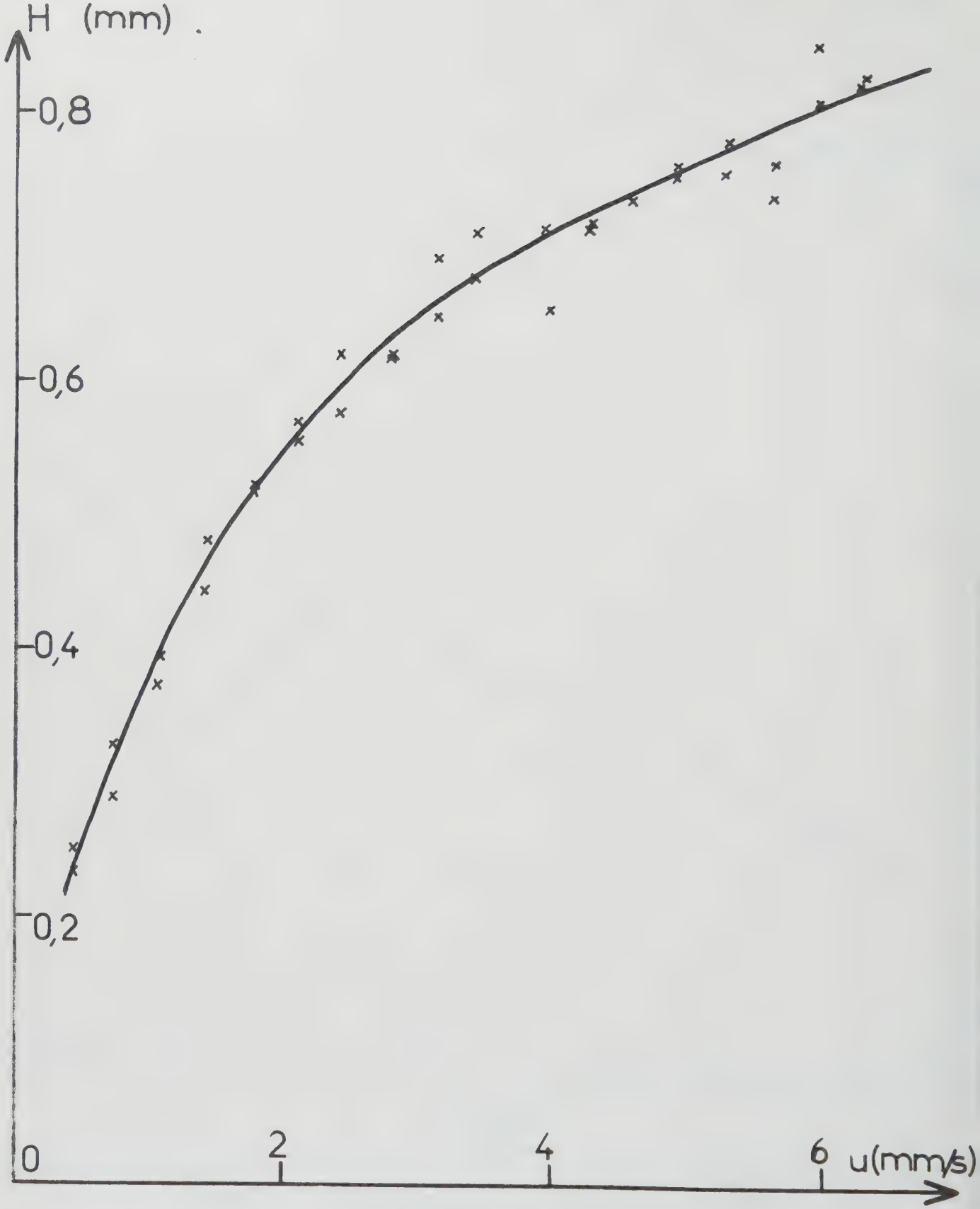


FIGURE 4

Courbe de HEPT pouvant être représentée par l'équation I-52

Colonne : 1 m x 1,6 mm
Adsorbant : Alumine neutre Woelm N 18 15-20 µm
Liquide vecteur : n-pentane
Soluté : benzène
T = 24°C.

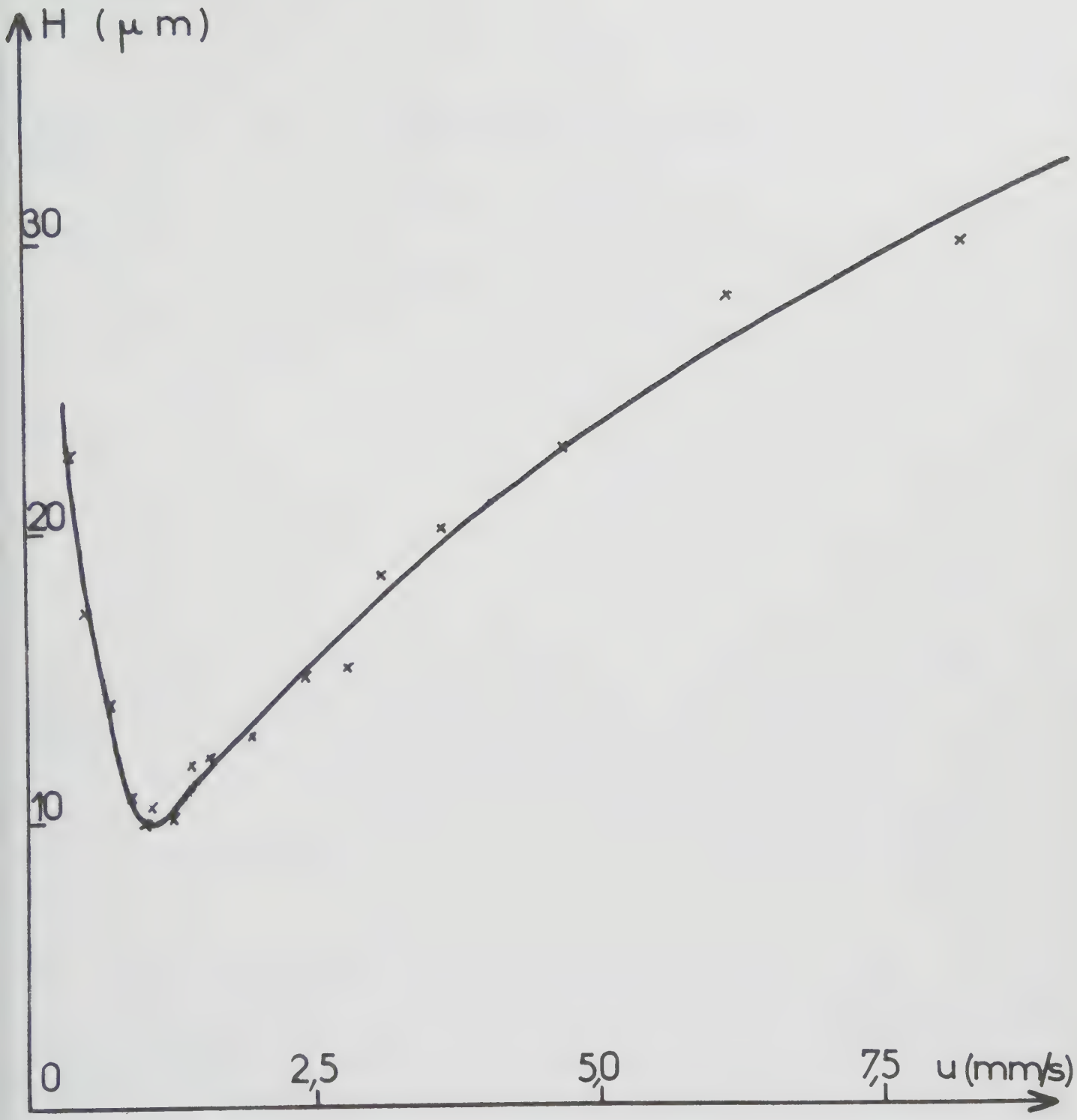


FIGURE 5

Courbe de HEPT tracée au voisinage du minimum

Colonne : 6 cm x 4 mm
Adsorbant : Partisil-5 5 µm
Liquide vecteur : n-heptane
Soluté : Chrysène (k' = 5)
Température ambiante.

D'autre part H dépend fortement du diamètre moyen des particules utilisées comme le montre la figure 6 où les courbes H(u) correspondant à différentes granulométries sont tracées. On a montré que les termes A et C (équation I-51) déterminés par la méthode des moindres carrés à partir des données expérimentales, sont respectivement proportionnels à d_p et d_p^2 (17). La figure 5 montre que, avec des granulométries très fines (5 µm), on peut obtenir des valeurs de H remarquablement faibles (10 µm).

La variation de H avec k' est beaucoup plus difficile à prédire. Comme l'a montré HUBER (8), on peut obtenir des courbes H(k') continûment croissantes, ou bien présentant un maximum selon la vitesse de la phase mobile ou bien encore, un minimum dans certains cas (18). La figure 7 montre les droites H(u) obtenues avec différents solutés en chromatographie liquide-liquide avec une colonne fortement chargée en phase stationnaire. Dans ce cas, le terme de résistance au transfert de masse en phase stagnante est négligeable devant le terme correspondant en phase stationnaire, on montre alors que le coefficient C des droites est approximativement proportionnel à la fonction $k'/(1 + k')^2$ (qui présente un maximum pour $k' = 1$) comme le prévoit l'équation I-41.

I - 3,5. Remarque générale sur les équations de HEPT.

Les équations I-48, I-49 et I-56 fournissent des expressions globales de la HEPT. Elles peuvent paraître contradictoires à première vue dans la mesure où les courbes de variations de H avec u, par exemple, obtenues avec chacune d'elles, n'ont pas rigoureusement la même forme mathématique. Cependant, étant donné la précision relativement faible avec laquelle les courbes expérimentales sont obtenues, ces trois équations peuvent être considérées comme identiques. L'équation semi-empirique I-56 est d'ailleurs préférable, parce que plus simple, les coefficients A et C n'ayant guère de signification physique.

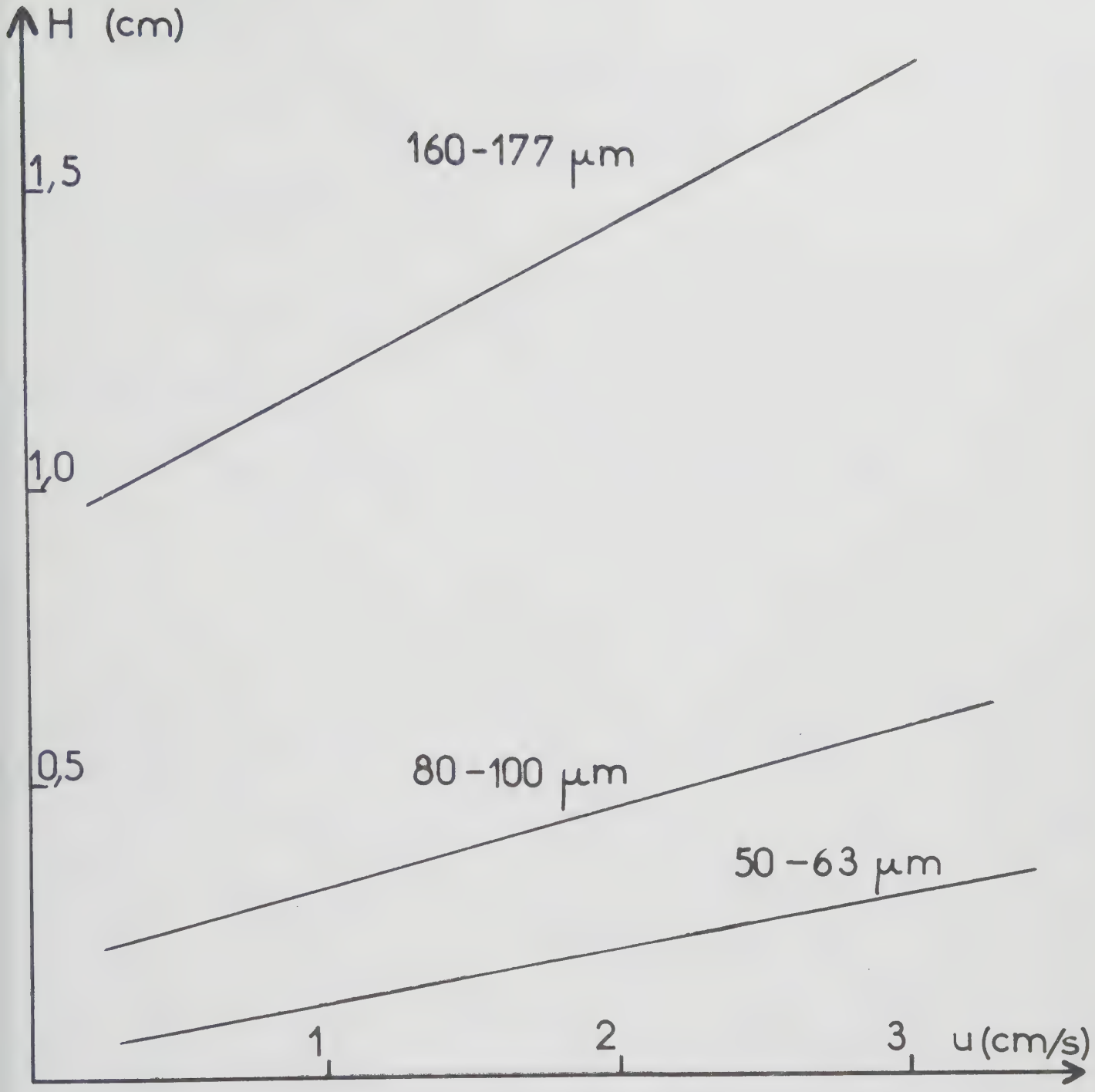


FIGURE 6

Courbes de HEPT (droites des moindres carrés) obtenues pour différentes granulométries.

Colonnes : 2 m x 2,1 mm
Adsorbant : Alumine neutre Woelm
Liquide vecteur : n-heptane
Soluté : benzène
Température ambiante

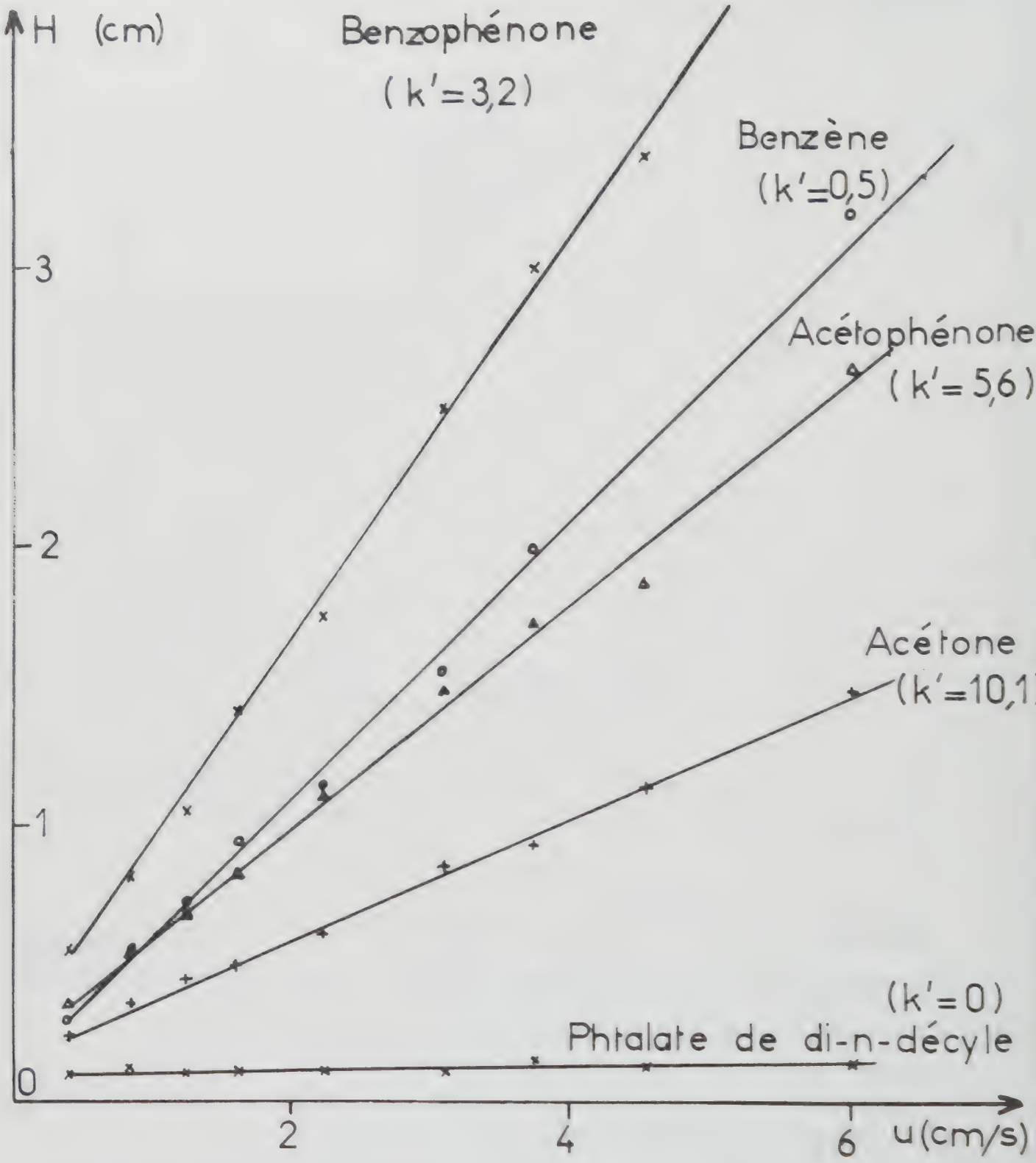


FIGURE 7

Chromatographie liquide-liquide

Influence du facteur de capacité sur la courbe de HEPT
Colonne : 2 m x 2,1 mm
Support : Sphérosil XOB 075 100-125 µm
Phase stationnaire : ββ'-oxydipropionitrile (0,8 g pour 1 g de support)
Liquide vecteur : n-heptane saturé en phase stationnaire
T = 31,0°C

BIBLIOGRAPHIE - CHAPITRE I

(1) H.P.G. DARCY, Les Fontaines publiques de la Ville de Dijon, Victor Dalmont, Paris, 1856

(2) F.C. BLAKE, Trans. Amer. Inst. Chem. Eng., 14, 415 (1922)

(3) J. KOZENY, S.B. Akad. Wiss. Wien, Abt.II a, 136, 271 (1927)

(4) J.C. GIDDINGS, Dynamics of Chromatography, Part 1, Principles and Theory, Marcel Dekker, New-York (1965)

(5) A.J.P. MARTIN, R.L.M. SYNGE, Biochem. J., 35, 1358 (1941)

(6) L. LAPIDUS, N.R. AMUNDSON, J. Phys. Chem.,56, 984 (1952)

(7) G. GUIOCHON, J. Chromatog., 14, 378 (1964)

(8) J.F.K. HUBER, Ber. Bunsen Ges. Phys. Chem., 77, 179 (1973)

(9) E. GLUECKAUF, Ion Exchange and its Applications, Soc. Chem. Ind., Londres(1955), 34

(10) J.J. VAN DEEMTER, F.J. ZUIDERWEG, A. KLINKENBERG, Chem. Eng. Sci., 5, 271 (1956)

(11) P.B. HAMILTON, D.C. BOGUE, R.A. ANDERSON, Anal. Chem., 32 1782 (1960)

(12) L.R. SNYDER, Anal. Chem., 39, 698 (1967)

(13) I. HALASZ, M. NAEFE, Anal. Chem., 44, 76 (1972)

(14) L.R. SNYDER, J. Chrom. Sci., 7, 352 (1969)

(15) J.C. GIDDINGS, Anal. Chem., 35, 1338 (1963)

(16) J.N. DONE, G.J. KENNEDY, J.H. KNOX, Gas Chromatography 1972, Montreux, ed. S.G. Perry, The Institute of Petroleum, Appl. Sci. Publ., Londres, p. 145

(17) M. MARTIN, Rapport de D.E.A. de Chimie Appliquée, Paris (1970)

(18) J.F.K. HUBER, A.M. VAN URK-SCHOEN, Anal. Chim. Acta, 58, 395 (1972)

ooo o ooo
o o
o

.../...

CHAPITRE II

LIMITATIONS DU MODELE SIMPLIFIE DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE. EFFETS DE PRESSION ET DE TEMPERATURE

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit un modèle simplifié de représentation d'une colonne chromatographique et dégagé quelques équations caractérisant la rétention des composés (équations I-18, I-20, I-23, I-25). Celles-ci reposent sur la connaissance de la vitesse linéaire u du liquide vecteur. La loi de DARCY (éq. I-13), reliant la vitesse au gradient de pression local, permet de déterminer cette vitesse à partir des conditions opératoires, dans la mesure où l'on peut intégrer cette équation différentielle. Avec les hypothèses faites au chapitre I, on obtient aisément l'équation I-14.

Toutefois l'existence d'un "effet de pression" et d'un "effet de température", lié en fait au précédent, modifie les conditions d'intégration de la loi de DARCY qui n'est d'ailleurs qu'une forme limite valable aux faibles vitesses. L'influence de l'effet de pression sur les caractéristiques de séjour dans la colonne d'un composé inerte sera discutée dans une première partie. La mise en évidence de l'effet de température est récente et son influence est encore très mal connue. Une approche sur la nature de cet effet et sur sa grandeur sera faite dans la seconde partie. Quelques mots seront dits dans la troisième partie sur l'influence de ces deux effets sur le coefficient de distribution.

.../...

II - 1. EFFET DE PRESSION

L'existence d'un gradient de pression, sans lequel aucune circulation de liquide n'est possible, entraîne un certain nombre d'effets :

1) le volume occupé par une masse donnée de liquide varie tout au long de la colonne, c'est-à-dire que le liquide est compressible et, de plus, son coefficient de compressibilité varie avec la pression p ;

2) la viscosité du liquide en chaque point de la colonne sera différente, puisque η varie avec p;

3) sous l'effet de la pression, la colonne se déforme, elle cesse d'être cylindrique pour devenir conique;

4) les particules elles-mêmes se déforment, d'où une modification des valeurs des différentes porosités et par conséquent de la perméabilité.

Enfin la loi de DARCY n'est plus applicable puisqu'elle n'est rigoureusement valide qu'à pression nulle.

Tous ces effets, cependant, restent assez faibles dans le domaine usuel de pression. Ils peuvent donc être étudiés séparément. L'incidence sur les caractéristiques de séjour dans la colonne est présentée dans la publication figurant à l'annexe 1 (A.1).On se contentera donc ici d'en dégager l'essentiel.

II - 1,1. Influence de la compressibilité des liquides

Le coefficient de compressibilité χ d'un fluide se déduit aisément d'une équation d'état $f(p,v,T) = 0$:

$$\chi = -\frac{1}{v}\frac{dv}{dp} \qquad \text{II.1}$$

.../...

v étant le volume du fluide à la pression p et à la température T supposée constante dans ce paragraphe. L'équation d'état de TAIT (A.I - eq. 1 et 4) s'applique bien aux liquides, chaque fluide étant caractérisé par deux constantes b et c (A.I - Table I). On remarque qu'elle s'applique également aux gaz parfaits (b = 0 , c = 1).

Si l'on suppose χ constant et égal à χ_o, on peut alors intégrer la loi de DARCY (A.I - eq. 15) et obtenir une expression de u_o, la vitesse en sortie de colonne, différente de celle, u_{oo}, qu'on aurait si la compressibilité était nulle (A.I - eq. 17). Il en est de même du temps de rétention t_m et du volume de rétention V_m d'un composé inerte (A.I - eq. 21 et 23). Un développement limité aux termes du second ordre donne :

$$t_m = t_o \left[1 + \frac{\chi_o^2}{12} (p_i - p_o)^2 \right] \qquad \text{II-2}$$

$$V_m = V_o \left[1 + \frac{\chi_o}{2} (p_i - p_o) + \frac{\chi_o^2}{4} (p_i - p_o)^2 \right] \qquad \text{II-3}$$

t_o et V_o se rapportant à $\chi = 0$, p_i et p_o étant les pressions d'entrée et de sortie.
Il en résulte donc que c'est essentiellement le volume de rétention qui est affecté par la compressibilité du liquide comme le montre le Tableau III de l'Annexe I (Table A.I - III), cette variation restant toutefois assez faible puisqu'elle ne dépasse guère 3 % à 200 bars pour le n-pentane qui est un des liquides les plus compressibles (A.I - Table I).

Si l'on tient compte de la variation de la compressibilité avec la pression (A.I - eq.6), l'intégration de la loi de DARCY (A.I - eq. 14) fournit des expressions différentes de t_m et V_m

.../...

(A.I - eq.31 et 36), soit :

$$t_m = \frac{L}{ju_o} \qquad \text{II-4}$$

$$V_m = \frac{V_o}{j} \qquad \text{II-5}$$

j étant un facteur de compressibilité défini d'après l'équation A.I - 33 qui est une extension du facteur de JAMES-MARTIN classique en chromatographie en phase gazeuse, que l'on retrouve en remplaçant b par o et c par 1. Le tableau A.I - IV donne les variations relatives de t_m et V_m pour différents liquides vecteurs lorsque la compressibilité est variable. Les écarts à l'idéalité ($\chi = 0$) sont plus faibles dans ce cas que dans celui où $\chi = \chi_o$ puisque la compressibilité diminue quand la pression augmente, la déviation de V_m n'atteint pas 6 % avec 500 bars de chute de pression pour le n-pentane et elle n'est que de 1,3 % à 200 bars pour le n-heptane.

II - 1,2. Variation de la viscosité avec la pression

A l'exception de l'eau en-dessous de 20°C, la viscosité s'accroît avec la pression, pratiquement linéairement dans un domaine de pressions allant jusqu'à 2000 bars, si bien que l'on peut écrire :

$$\eta = \eta_o (1 + \alpha p) \qquad \text{II-6}$$

$\eta_o(1 + \alpha)$ étant la viscosité à pression atmosphérique. Les valeurs de η et α sont données au Tableau A.I - II pour différents liquides usuels. Cette variation de η avec p va donc affecter le profil de pression dans la colonne, qui cessera d'être linéaire, et par conséquent u_o et t_m, mais cela ne modifiera pas V_m, le

.../...

volume de liquide qui doit percoler dans la colonne pour éluer un composé inerte. L'intégration de la loi de DARCY (A.I - eq. 16) fournit une expression de u_o (A.I - eq. 39) et de t_m (A.I - eq. 41) dont on peut faire un développement limité au premier ordre :

$$t_m = t_o \left[1 + \frac{\alpha}{2} (p_i + p_o) \right] \qquad \text{II-7}$$

Les variations relatives de t_m et u_o sont portées au Tableau A.I - V. Dans ce cas, elles sont assez importantes puisqu'elles atteignent 10 % pour un certain nombre de liquides lorsque p_i = 200 bars et près de 30 % pour p_i = 500 bars (p_o = 1bar).

II - 1,3. Combinaison des effets de compressibilité et de viscosité

Dans ce cas, u_o est donnée par l'équation A.I - 45 qui n'a pas de solution analytique pour des valeurs quelconques de c. Une solution numérique est possible. On en déduit alors les variations relatives de u_o par rapport à celles d'un liquide idéal ($\chi = 0$, $\eta = \eta_o (1 + \alpha)$). Les valeurs numériques sont portées sur le Tableau A.I - VI où l'on remarque qu'elles sont inférieures à 1. Or, les deux effets de compressibilité et de viscosité ont des répercutions adverses sur la vitesse en sortie de colonne, le premier tend à l'augmenter (car le liquide se détend au cours de sa progression dans la colonne), le second tendant à la diminuer. L'effet de viscosité est donc prédominant sur celui de compressibilité.

II - 1,4. Déformation de la colonne et de son garnissage sous l'effet de la pression.

La pression modifie le diamètre intérieur de la colonne qui devient donc pratiquement conique. La loi de HOOKE (eq. A.I - 52)

.../...

exprimant la déformation élastique des matériaux et l'équation de LAME (eq. A.I - 53) exprimant la contrainte provoquant cette déformation dans le cas d'un tube cylindrique, permettent de calculer la section de la colonne en fonction de la pression si l'on connait le module de YOUNG du matériau constituant ce tube (eq.A.I - 54,55 et 56).

D'autre part, les particules se contractent plus ou moins sous l'effet de la pression selon la valeur du coefficient de compressibilité du solide, d'où une diminution du diamètre des particules (eq. A.I - 59). Il en résulte que la porosité externe et la porosité totale, et par conséquent la perméabilité, vont dépendre de l'abscisse de la colonne (eq.A.I - 64).

Si l'on néglige la variation de compressibilité du liquide (ce qui est permis pour étudier de faibles effets que l'on pourra additionner ensuite), on peut alors, en écrivant que le débit est indépendant de l'abscisse de la colonne, intégrer la loi de DARCY (eq. A.I - 68) et en dériver les expressions de u_o, t_m et V_m (eq. A.I - 69,71,73). Les valeurs numériques de leurs variations relatives sont portées au Tableau A.I - VIII pour une colonne en acier inoxydable remplie de gel de silice. On remarque donc que l'effet de la déformation de la colonne et de son garnissage sur le volume de rétention d'un composé est très faible (inférieur à 0,2 % à 500 bars dans le cas défavorable d'un support superficiellement poreux). L'effet sur le temps de rétention(et sur la vitesse en sortie de colonne) est un peu plus important, mais n'atteint pas 0,5 % sous 200 bars.

Il est donc bien permis de négliger dans la pratique cet effet vis-à-vis des deux précédents.

.../...

II - 1,5. Ecart à la loi de DARCY

Lorsque la vitesse du liquide vecteur s'accroît, le gradient de pression dans la colonne n'est plus proportionnel à la vitesse du liquide. Ceci est dû à une importance croissante des forces d'inertie sur les forces visqueuses et à une perte d'énergie cinétique dans les tourbillons stables existant en régime laminaire dans l'espace intergranulaire. La loi de DARCY doit alors être remplacée par l'équation d'ERGUN (eq.A.I - 48) lorsque le nombre de REYNOLDS apparent $\left[dp\ \rho u\ \varepsilon_{tot}/\eta(1 - \varepsilon_e)\right]$ dépasse quelques unités. Il en résulte des variations de la vitesse en sortie de colonne et du temps de séjour d'un composé inerte, tandis que le volume de rétention reste inchangé si le liquide est supposé incompressible. Ces variations sont portées au Tableau A.I - VII dans le cas d'une colonne classique remplie de particules de taille moyenne. La déviation à la loi de DARCY est proportionnelle au diamètre des particules, à la vitesse du liquide et inversement proportionnelle à sa viscosité cinématique. L'écart relatif en fonction de la vitesse est porté pour différents diamètres des particules sur la figure A.I -1 et pour différentes viscosités cinématiques sur la figure A.I - 2. Pour un liquide donné, la déviation est donc d'autant plus faible que l'on travaille sous faible pression avec des particules fines.

II - 1,6. Effet global

De tous les effets ainsi étudiés, le plus important est celui de la variation de viscosité sur le temps de rétention. Le volume de rétention est surtout affecté par la compressibilité du liquide. L'effet global est toujours négligeable pour la détermination de la rétention relative. Il peut devenir important pour

.../...

des mesures de précision de temps de rétention, en vue, par exemple, de l'identification d'un composé lorsque les conditions opératoires ont changé.

En fait, cette étude des effets de la pression, entreprise à l'époque où l'on s'orientait vers l'emploi de pressions très élevées, comme en témoignent les possibilités offertes par certains appareils commerciaux conçus à cette période, voit son intérêt diminuer maintenant que l'on préconise l'utilisation de pressions relativement faibles (voir chapitre III).

II - 2. EFFET DE TEMPERATURE

Comme cela a déjà été mentionné (1,2), le travail des forces de pression servant à déplacer le liquide dans la colonne est transformé en chaleur par les forces de friction au contact des particules. Il en résulte un échauffement du liquide lié à sa décompression au cours de sa progression dans la colonne. Cet effet, négligé jusqu'à présent parce qu'insensible lorsque le temps de séjour est suffisamment long pour permettre la dissipation de la chaleur dégagée, est nettement ressenti lorsqu'on déplace la main le long d'une colonne de 50 cm de long remplie de particules de 7 µm dans laquelle l'heptane est soumis à une chute de pression de 300 bars. On a mesuré une variation de température de 2°C entre la sortie et l'entrée d'une colonne de 6 cm remplie avec ces particules, la pression de l'heptane à l'entrée étant de 150 bars.

En écrivant que le travail $\Delta(PV)$ fourni par les forces de pression est égal à la chaleur absorbée par le liquide, ce qui revient à considérer en régime d'équilibre la colonne comme un

.../...

système adiabatique, on obtient une expression de la variation de température du liquide ΔT entre l'entrée et la sortie de la colonne :

$$\Delta T = - \frac{\Delta P}{C_V} \qquad \text{II-8}$$

où C_V est la capacité calorifique du liquide à volume constant.

Le Tableau 1 (page suivante) donne les valeurs de capacités calorifiques à pression constante C_p qui, pour des liquides, sont très voisins de celles à volume constant. Cela montre que, pour la plupart des liquides, à l'exception de l'eau, l'accroissement de température est de 0,1°C/bar. Pour l'eau, on obtient 0,024°C/bar.

En fait, la colonne n'est pas adiabatique car la chaleur dégagée se dissipe à l'extérieur par l'intermédiaire du métal constituant la colonne. Si T_o est la température ambiante et k le coefficient de dissipation, la loi de conservation de l'énergie s'écrit localement :

$$dT = - \frac{dP}{C_V} - k\,(T - T_o)\,dt \qquad \text{II-9}$$

Le temps de passage dt dans l'élément de longueur dx est lié à la vitesse par :

$$u = \frac{dx}{dt} = - \frac{k_o\, dp^2}{\eta} \frac{dP}{dx} \qquad \text{II-10}$$

On obtient donc en supposant u, η et C_V constants tout au long de la colonne :

$$\frac{d(T - T_o)}{dP} - k \frac{k_o dp^2}{\eta\, u^2} (T - T_o) + \frac{1}{C_V} = 0 \qquad \text{II-11}$$

.../...

TABLE 1

CAPACITES CALORIFIQUES A PRESSION CONSTANTE A 25°C DE QUELQUES LIQUIDES (3) ET VARIATIONS DE TEMPERATURE DANS UNE COLONNE ADIABATIQUE.

	C_p (erg/°C/cm^3)	$\frac{\Delta T}{\Delta P}$ (°C/bar)
n-pentane	1,055 x 10^7	0,095
n-hexane	1,20 x 10^7	0,083
n-heptane	1,16 x 10^7	0,086
Benzène	0,921 x 10^7	0,108
Toluène	0,97 x 10^7	0,103
Méthanol	1,21 x 10^7	0,082
Ethanol	1,25 x 10^7	0,080
Eau	4,18 x 10^7	0,024

La solution de cette équation différentielle s'obtient à l'aide des conditions aux limites ($P = \Delta P$, $T = T_o$; $P = 0$, $T = T_o + \Delta T$) :

$$\Delta T = - \frac{1}{k\, C_V} \frac{k_o dp^2}{\eta} \left(\frac{\Delta P}{L}\right)^2 \left[1 - \exp\left(- k \frac{\eta\, L^2}{k_o dp^2\, \Delta P}\right)\right] \qquad \text{II-12}$$

soit encore :

$$\Delta T = - \frac{\Delta P}{k C_V t_m} \left(1 - e^{- k t_m}\right) \qquad \text{II-13}$$

Un développement limité au premier ordre permet d'écrire lorsque le produit kt_m est petit :

$$\Delta T = - \frac{\Delta P}{C_V} \left(1 - \frac{k t_m}{2}\right) \qquad \text{II-14}$$

Ces équations montrent donc que ΔT dépend de la chute de pression et du temps de séjour dans la colonne, mais est indépendant de la longueur de celle-ci. Cet effet est important lorsque des analyses rapides sont effectuées dans des colonnes remplies de très fines particules ce qui nécessite de fortes pressions d'entrée . Il n'est alors pas étonnant que des liquides à faible point d'ébullition (n-pentane, éther diéthylique) soient d'un emploi délicat en chromatographie en phase liquide, l'apparition de bulles gazeuses rendant la détection impossible. Il peut même arriver que lors du remplissage des colonnes par la méthode d'équidensité sous très forte pression (> 1000 bars), le liquide vecteur soit totalement volatilisé. Cet effet limite sérieusement l'emploi de la chromatographie en phase liquide pour des mesures de chimie physique.

D'autre part, à côté de ce gradient de température axial, il existe un gradient radial dû à la dissipation de la chaleur.

.../...

Celui-ci peut augmenter les inégalités de vitesse dans une section droite de la colonne à cause de la variation rapide de la viscosité avec la température. Le coefficient de diffusion en dépend également. On connait mal à l'heure actuelle, l'influence globale de cet effet sur la HEPT. Néanmoins, la signification de celle-ci peut être remise en cause puisque H peut dépendre de la longueur de la colonne. Alors que l'influence de l'effet de pression sur H peut être éliminée en traçant des courbes H(u) à pression moyenne constante, l'influence de l'effet de température ne peut pas être supprimée par un tel artifice.

II - 3. INFLUENCE DE CES EFFETS SUR LE COEFFICIENT DE DISTRIBUTION :

Dans ce chapitre, l'influence des effets de pression et de température sur les caractéristiques de séjour dans la colonne d'un composé inerte a été étudiée. Les effets de la pression sur le coefficient de distribution ont été étudiés (4). Ils résultent de la relation thermodynamique:

$$\left[\frac{\partial(\Delta G)}{\partial P}\right]_T = \Delta V \qquad \text{II-15}$$

où ΔV et ΔG sont respectivement les variations du volume et de l'enthalpie libre du soluté associées au transfert de la phase mobile à la phase stationnaire.

Bien que les données de volumes molaires partiels à dilution infinie de solutés dans les solvants usuels en chromatographie liquide-liquide soient assez rares, il a été noté (5) que leurs variations d'un solvant à l'autre étaient généralement inférieures à 10 cm^3/mole. Il en résulte une variation du coefficient de partage K inférieure à 4 % pour 100 bars. Cette variation est beaucoup plus délicate à prédire en chromatographie d'adsorption, étant donné la difficulté de définir un volume molaire partiel dans ce cas.

L'influence de la température peut être déduite de la relation :

$$\left[\frac{\partial(\Delta G)}{\partial T}\right]_P = -\Delta S \qquad \text{II-16}$$

Cependant, les valeurs expérimentales de variations d'entropie de transfert des solutés étant à peu près inexistantes, il n'est pratiquement pas possible de prédire les variations de K avec T en utilisant cette relation.

Lors de l'étude de l'effet de la température sur le coefficient de distribution, on a constaté une décroissance puis une augmentation de Log k' en fonction de $\frac{1}{T}$ (6), résultat pour le moins curieux et inattendu. En fait, une grande prudence doit être observée quant aux conclusions tirées de ce genre d'étude. En effet, la teneur en eau du liquide vecteur en équilibre avec l'adsorbant (gel de silice ou gel d'alumine) dont l'influence est très grande sur la rétention (7,8), dépend de la température. Faire varier la température revient donc parfois à modifier le système chromatographique, ce qui enlève toute signification à l'étude directe de l'influence de T sur k'. De ce fait, l'utilisation d'un gradient de température imposé à la colonne, qui, dans quelques cas, peut avoir des applications analytiques intéressantes (9,10), est d'un emploi très limité.

BIBLIOGRAPHIE - CHAPITRE II

(1) J.C. GIDDINGS, Dynamics of Chromatography - Part I - Principles and Theory, Marcel Dekker, New-York, (1965)p.219.

(2) J. ASSHAUER, I. HALASZ, J. Chrom. Sci, 12, 139 (1974)

(3) Techniques de l'Ingénieur, Schiltigheim, France, K540 - 13

(4) J.C. GIDDINGS, Separat. Sci., 1, 73 (1966)

(5) D.C. LOCKE, Advances in Chromatography, ed.J.C. Giddings, R.A. Keller, 8, 47 (1969)

(6) M. MARTIN, Rapport de D.E.A de Chimie Appliquée, Paris,(1970)

(7) H. BROCKMANN, H. SCHODDER, Ber., 74, 73 (1941)

(8) H. ENGELHARDT, H. WIEDEMANN, Anal. Chem., 45, 1641 (1973)

(9) G. HESSE, H. ENGELHARDT, J. Chromatog., 21, 228 (1966)

(10) M. KREJCI, D. KOURILOVA, J. Chromatog., 91, 151 (1974).

CHAPITRE III

OPTIMISATION EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

Les nombreuses études d'optimisation en chromatographie en phase liquide entreprises ces dernières années n'ont pas nécessairement conduit aux mêmes conclusions quant aux conditions opératoires. Pour comprendre l'origine de ces divergences, nous analyserons, dans une première partie,le problème général de l'optimisation avant, dans une deuxième partie, d'en appliquer les résultats à l'optimisation du temps d'analyse et de la résolution en fonction du diamètre des particules et de la pression d'entrée, alors que la troisième partie sera consacrée à celle de la pression nécessaire pour obtenir une analyse donnée. Les conclusions que l'on en tirera permettront de comprendre ce qui s'est passé depuis le renouveau de la chromatographie en phase liquide en 1967 et ce qui va probablement se passer dans les années à venir.

III - 1. PROBLEME GENERAL DE L'OPTIMISATION

Ce problème est posé lorsqu'on dispose d'un certain nombre n de variables et de r relations ($r \leqslant n$) entre ces variables. Il y a alors $(n - r)$ degrés de liberté. On cherche donc à optimiser une des n variables en fonction des $(n - 1)$ autres variables du système, soit en fait en fonction de $(n - r)$ variables indépendantes choisies parmi ces $(n - 1)$ autres variables. Or il y a C_{n-1}^{n-r} façons de choisir $(n - r)$ variables dans un ensemble de $(n - 1)$.

.../...

En conséquence, le nombre k de théories d'optimisation possibles sera :

$$k = n\, C_{n-1}^{n-r} = \frac{n!}{(n-r)!\,(r-1)!} \qquad \text{III-1}$$

Dans le cas de la chromatographie, les différentes variables définies au Chapitre I peuvent être divisées en deux groupes : les paramètres principaux et les paramètres secondaires. Le critère de sélection est le suivant : on suppose choisi le système chromatographique (c'est-à-dire l'ensemble solutés-liquide vecteur-phase stationnaire) en chromatographie analytique isotherme (le diamètre de la colonne et la température sont considérés comme fixes) lorsqu'on dispose d'une masse limitée d'échantillon et d'une technique de remplissage déterminée et reproductible.

La liste des paramètres de ces deux groupes est donnée dans l'annexe 2 (**A.II**). Les neuf variables principales sont reliées entre elles par les équations I-16, I-20, I-33, I-36, I-38 (soit encore les équations A.II-1, A.II-2, A.II-4 à A.II-6) et une équation de HEPT du type :

$$H = f\,(u,\ d_p,\ \text{paramètres secondaires}) \qquad \text{III-2}$$

Remarque : Compte tenu des équations I-24 et I-25, l'équation I-38 peut s'écrire sous la forme (Equation A.II-6) :

$$C_{max} = \frac{4\, m \sqrt{N}}{\pi\, \varepsilon_{tot} (1 + k')\, d_c^2\, L \sqrt{2\pi}} \qquad \text{III-3}$$

On dispose donc d'un système de neuf variables et de six relations entre ces variables. En fait, étant donné la relation biunivoque entre N et R_S, on peut considérer qu'on a huit variables reliées par cinq équations (A.II-2 à A.II-6 par exemple). Le système comporte donc trois variables indépendantes.
Le nombre k de théories d'optimisation possibles est alors : $8\, C_7^3 = 280$. Il n'est alors pas surprenant que les différentes études d'optimisation entreprises ces derniers temps n'aboutissent

.../...

pas aux mêmes conclusions : les buts recherchés sont différents. Heureusement, toutes ces théories ne présentent pas nécessairement un intérêt. Par un choix approprié de variables intéressantes à optimiser et de variables indépendantes possibles (voir Annexe II), on obtient encore 26 théories d'optimisation intéressantes.

III - 2. OPTIMISATION DU TEMPS D'ANALYSE ET DE LA RESOLUTION

Ce double problème a été souvent considéré comme "le" problème d'optimisation en chromatographie en phase liquide, comme en phase gazeuse, d'ailleurs.
Sa résolution est aisée si l'on utilise une expression simple de la HEPT comme l'équation I-52 que l'on peut expliciter sous la forme suivante proposée par SNYDER (3) :

$$H = \lambda \, u^{\gamma} \, d_p^{\beta} \qquad \text{III-4}$$

λ , γ et β étant des constantes. $\gamma = 0,4$ et $\beta = 1,8$ peuvent être considérées comme des valeurs moyennes d'après de nombreuses études expérimentales (voir Annexe III).
Comme cela a été mentionné au Chapitre I, cette équation reflète seulement une partie de la courbe de HEPT. Par conséquent, toutes les conclusions que l'on peut tirer de cette étude d'optimisation ne seront valables que lorsque le terme de couplage sera prédominant sur les autres termes de l'équation de HEPT, soit pratiquement (1), si l'on utilise des particules totalement poreuses, lorsque la vitesse réduite ν est comprise entre 6 et 120.

Dans le cas étudié ici, il est intéressant de choisir ΔP et d_p comme variables indépendantes. L'expression de t_R en fonction de R_S, ΔP et d_p s'obtient facilement en éliminant u, N et H entre les équations I-16, I-20, I-33 et III-4. Elle est donnée dans l'Annexe III (équations A.III-10 et 11). Elle peut être écrite sous la forme $R_S = f\,(t_R, \Delta P, d_p)$. On a donc, avec les valeurs de γ et β choisies :

$$t_R \propto R_S^{2,86} \, \frac{1}{\Delta P^{0,43}} \, d_p^{1,71} \qquad \text{III-5}$$

ou bien :

$$R_S \propto t_R^{0,35} \cdot \Delta P^{0,15} \cdot \frac{1}{d_p^{0,6}} \qquad \text{III-6}$$

La longueur de la colonne se calcule alors d'après l'équation A.III-9.

Si l'on observe (voir Annexe III) que les analyses classiques étaient effectuées dans un domaine où l'équation III-4 est valable, on comprend alors l'avantage énorme de la chromatographie en phase liquide sous haute pression utilisant des fines particules par rapport à celle utilisée classiquement avant 1967 : une réduction d'un facteur 20 du diamètre des particules (de 200 à 10 µm) et une augmentation de la chute de pression par 1000 (de 0,3 à 300 bars) ont permis de réduire le temps d'analyse à résolution constante par les facteurs 170 et 20 respectivement, soit une réduction globale par 3400, (de 1 jour à moins de 30 secondes), ceci correspondant à une augmentation par un facteur 17 de la résolution à temps constant.

Il apparaît donc que le facteur essentiel d'amélioration des performances en chromatographie en phase liquide est la diminution du diamètre des particules. Si l'appellation "chromatographie en phase liquide sous pression" de cette forme moderne, aujourd'hui conventionnelle, de la chromatographie en phase liquide peut être justifiée, c'est parce que l'augmentation de la pression a pu se faire dans un très large domaine (de 1 à 10000, voire même davantage).

Il paraît donc impossible d'améliorer notablement le niveau des performances actuelles par une augmentation de pression à cause des très grosses difficultés technologiques que peut présenter l'utilisation de pressions de l'ordre de 12 à 13000 bars nécessaires pour diminuer 5 fois le temps d'analyse par rapport aux valeurs actuelles. Une réduction du diamètre des particules est possible (des particules de 5 µm sont actuellement disponibles dans le commerce), cependant celle-ci peut être limitée par la pression nécessaire pour travailler au minimum de la courbe de HEPT (Eq. A.III-14), valeur

.../...

en-dessous de laquelle il n'y a aucun intérêt à travailler, la perte de temps s'accompagnant d'une perte d'efficacité.

D'autre part, une amélioration accrue des performances peut conduire à un temps d'analyse trop court (quelques secondes) ou à une résolution trop bonne (supérieure à 2 ce qui entraîne une perte de temps ou bien, si celui-ci est raisonnablement court, l'apparition de problèmes associés aux volumes morts à l'extérieur de la colonne) d'où la nécessité d'étudier s'il est vraiment opportun de travailler à des pressions très élevées, en général coûteuses.

III - 3. OPTIMISATION DE LA PRESSION NECESSAIRE POUR OBTENIR UNE ANALYSE DETERMINEE.

Les paramètres secondaires étant fixés, une analyse sera déterminée par la résolution et le temps d'analyse, soit encore, avec les hypothèses faites au Chapitre I, par le nombre de plateaux théoriques du composé le plus retenu de la paire la plus difficile à séparer et son temps de rétention, t_R, qu'on appellera temps d'analyse. Dans le cas où ce composé n'est pas le dernier à être élué, le temps d'analyse sera proportionnel à t_R, le coefficient de proportionnalité étant le rapport des valeurs de $(1 + k')$.

Pour donner un caractère général à cette étude d'optimisation, une équation de HEPT valable dans tout le domaine de vitesses, telle que l'équation I-56, est nécessaire. L'élimination de H, u et d_p entre les équations I-16, I-20, I-33 et I-56 (Eq. A.II-2 à A.II-5) fournit une relation entre ΔP, L, N et t_R, qui est une équation du troisième degré en $\Delta P^{1/3}$. La résolution de cette équation permet d'écrire ΔP en fonction de L, N et t_R. On obtient ainsi les équations A.II-A 13 et A.II-A 15 selon que L est supérieur ou inférieur à la valeur de transition L_o, introduite mathématiquement, à laquelle correspondent les valeurs ΔP_o et d_{p_o} pour la chute de pression et le diamètre des particules.

.../...

N et t_R étant constants pour une analyse déterminée, on peut alors tracer les variations de ΔP avec L (A.II,figure 1), ou, si l'on écrit ΔP en fonction de d_p, N et t_R, celles de ΔP avec d_p (A.II, figure 2). Les courbes obtenues dépendent bien entendu de N et t_R ainsi que des paramètres secondaires. Si l'on utilise les variables réduites p, ℓ et δ_p définies par les équations A.II-10 à A.II-15, on obtient des courbes $p(\ell)$ et $p(\delta_p)$ qui ne dépendent que du seul paramètre α (équation A.II-16), fonction des coefficients A, C et γ de l'équation I-56, et donc indépendants de N et t_R (équations A.II-A 20 et A.II-A 21 , figures A.II-3 et A.II-4). Ces courbes ont donc un caractère très général.

La présence d'asymptotes verticales indique qu'une analyse donnée ne sera possible que si L et d_p remplissent les deux conditions suivantes :

$$L > \sqrt{2\gamma \frac{D_m}{(1+k')} N t_R} \qquad \text{III-7}$$

$$d_p < \sqrt{\frac{D_m}{C(1+k')} \frac{t_R}{N}} \qquad \text{III-8}$$

Mais la propriété la plus intéressante de ces courbes est l'existence d'un minimum. Autrement dit, il existe un certain couple (L_{opt}, d_{popt}) pour lequel la pression nécessaire pour obtenir l'analyse désirée sera minimale. En raisonnant par l'absurde, on peut montrer (Annexe II) que cette pression est celle pour laquelle la courbe H(u) obtenue avec la colonne de longueur L_{opt} remplie de particules de diamètre d_{opt} présente un minimum. La valeur de la vitesse réduite ν_{opt} correspondant à ce minimum s'obtient par dérivation de l'équation I-55 :

si : $729\gamma C^2 < 2A^3$

$$\nu_{opt} = \left(\frac{A}{9C}\right)^{3/2} \left\{ 2\cos\left[\frac{1}{3} \text{ Arc cos } \left(\frac{729\gamma C^2}{A^3} - 1\right)\right] - 1 \right\}^{3/2} \qquad \text{III-9}$$

.../...

si $729\,\gamma\,C^2 > 2A^3$

$$\nu_{opt} = \left\{ \sqrt[3]{\frac{\gamma}{C}\left(1 - \frac{A^3}{729\gamma C^2}\right)} \left[\sqrt[3]{1 + \sqrt{1 - \frac{1}{\left(1 - \frac{729\gamma C^2}{A^3}\right)^2}}} + \sqrt[3]{1 - \sqrt{1 - \frac{1}{\left(1 - \frac{729\gamma C^2}{A^3}\right)^2}}} \right] - \frac{A}{9C} \right\}^{3/2} \qquad \text{III-10}$$

La valeur correspondante h_{min} de h se déduit de l'équation I-55. Dans le cas intermédiaire où : $729\,\gamma\,C^2 = 2A^3$, on a :

$$\nu_{opt} = \left(\frac{A}{9C}\right)^{3/2} \quad , \quad h_{min} = \frac{14}{27}\,\frac{A^{3/2}}{C^{1/2}} \qquad \text{III-11}$$

Des valeurs ainsi calculées de ν_{opt} et h_{min}, on peut déduire la pression minimale nécessaire ΔP_{min} pour effectuer l'analyse désirée et les valeurs L_{opt} et $d_{p_{opt}}$ permettant de construire la colonne :

$$\Delta P_{min} = h_{min}^2 \cdot \frac{\eta(1 + k')}{k_o} \cdot \frac{N^2}{t_R} \qquad \text{III-12}$$

$$L_{opt} = \sqrt{h_{min}\,\nu_{opt}\,\frac{D_m}{(1 + k')}\,N\,t_R} \qquad \text{III-13}$$

$$d_{p_{opt}} = \sqrt{\frac{\nu_{opt}}{h_{min}}\,\frac{D_m}{(1+k')}\,\frac{t_R}{N}} \qquad \text{III-14}$$

L'équation III-12 montre que la pression minimale nécessaire pour effectuer une analyse varie comme le rapport N^2/t_R. Cette pression

.../...

est, en général, beaucoup plus basse que celles actuellement employées pour des analyses courantes (voir Tableau A.II-III). Alors, la colonne est courte et les particules sont fines. Obtenir 5000 plateaux théoriques en 5 minutes pour un composé ayant un k' égal à 2 est possible avec une chute de pression inférieure à 12 bars à travers un lit de particules de 7 µm long de 11 cm. Dans ces conditions, il est possible d'obtenir de très bonnes performances en tirant profit de la pression maximale disponible avec un appareillage donné, comme le montre la figure A.II-8. 100.000 plateaux théoriques en 1 heure ne constituent pas une performance inaccessible avec les chromatographes en phase liquide actuellement commercialisés.

En résumé, les conclusions de cette étude se distinguent nettement de celles des précédentes études d'optimisation qui préconisent l'utilisation de grandes vitesses linéaires. La raison essentielle en est, outre la différence de position du problème d'optimisation, que nous avons considéré la forme de la courbe H(u) dans tout le domaine de vitesses linéaires et non pas dans un certain domaine, limité, usuel lorsque le diamètre moyen des particules est supérieur à 15 µm, mais qui ne l'est plus pour de très fines particules.

Ce renversement de tendance, qui consiste à obtenir des analyses performantes courantes en travaillant au minimum de la courbe H(u), à des pressions ne dépassant pas quelques bars ou quelques dizaines de bars, va probablement affecter le développement de la chromatographie en phase liquide dans les années à venir, comme le montrent déjà quelques applications analytiques (4 -6, Chapitre VI), ce qui n'est pas sans conséquence sur le dessin de l'appareillage (7, Chapitre V). Les équations III-9 à III-14 permettent alors de déduire quelques règles pratiques pour le choix des conditions opératoires (8).

.../...

BIBLIOGRAPHIE - CHAPITRE III

(1) G.J. KENNEDY, J.H. KNOX, J. Chrom. Sci., 10, 549 (1972)

(2) J.N. DONE, J.H. KNOX, J. Chrom. Sci., 10, 606 (1972)

(3) L.R. SNYDER, J. Chrom. Sci., 7, 352 (1969)

(4) J.X. KHYM, J. Chromatog., 97, 277 (1974)

(5) Modern Liquid Chromatography on Spherosil

J. VERMONT, M. DELEUIL, A.J. DE VRIES, C.L. GUILLEMIN, Anal. Chem., à paraître.

(6) Low pressure and fine particle-size in high resolution liquid chromatography. Application to separation of phenothiazines and of acrylic and methacrylic acid mixtures.

M. CAUDE, J.P. LEFEVRE, R. ROSSET, Chromatographia, à paraître.

(7) Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography. II - Problems in equipment design.

M. MARTIN, C. EON, G. GUIOCHON, J. Chromatog., à paraître.

(8) Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography. III - A practical method to choose the experimental conditions in liquid chromatography.

M. MARTIN, C. EON, G. GUIOCHON, J. Chromatog., à paraître.

ooo o ooo

o o

o

CHAPITRE IV

SENSIBILITE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

Alors que des progrès importants réalisés ces derniers temps dans le domaine de la vitesse d'analyse et de l'efficacité permettent d'effectuer des analyses hautement performantes, la détection reste le point faible d'un chromatographe en phase liquide, ce qui peut parfois limiter les applications de cette technique.

La limite de détection est déterminée d'une part par les performances intrinsèques du détecteur (bruit de fond, sensibilité), d'autre part, et c'est ce qui nous intéresse ici, par l'opération chromatographique. En effet, celle-ci étant un maillon de tout un schéma analytique, le prix de cette étape additionnelle est la dilution que subissent les solutés au cours de leur passage dans la colonne, la meilleure limite de détection étant obtenue quand on n'utilise pas de colonne; alors bien entendu aucune séparation n'a lieu, d'où un compromis à trouver entre résolution et limite de détection. Par ailleurs, la quantité d'échantillon injectée va influencer la détection des solutés. Elle est déterminée par le volume injecté et la concentration des solutés dans l'échantillon, celle-ci ne peut pas toujours être accrue (faible solubilité des solutés dans le solvant, risque de surcharge de la colonne, analyse de traces). L'augmentation du volume injecté reste alors le seul moyen d'agir sur la quantité injectée. Une telle augmentation se trouve

.../...

cependant limitée par la perte d'efficacité pouvant en résulter. Ce problème sera discuté dans la cinquième partie de ce chapitre.

Auparavant, dans les quatre premières parties, nous verrons successivement comment peuvent être définies des grandeurs comme la limite de détection, la sensibilité qui, souvent, prêtent à confusion, l'influence des paramètres de la colonne sur la dilution, traitée indépendamment puis en relation avec la résolution, et également le temps d'analyse.
A l'exception de cette quatrième partie, tous ces points sont exposés en détail dans l'annexe IV. On se contentera ici d'en résumer les conclusions.

IV - 1. DEFINITION DE QUELQUES GRANDEURS LIEES A LA REPONSE DU DETECTEUR

Les détecteurs sensibles à la concentration du soluté sont les plus couramment utilisés en chromatographie en phase liquide (réfractomètres différentiels, absorptiomètres U.V). On définit leur sensibilité, S, comme la réponse en millivolt à un changement unitaire de concentration (exprimée en g/cm^3) du soluté, cette réponse étant supposée linéaire dans le domaine d'utilisation et le signal non atténué. S est aussi parfois appelé le facteur de réponse du détecteur pour le soluté.
Le niveau de bruit de fond de la ligne de base, G, est défini comme l'amplitude pic à pic du bruit, exprimé en millivolt.

Alors la concentration minimale détectable dans le détecteur est définie en termes d'un multiple du rapport signal-bruit. Ce multiple λ est choisi arbitrairement, il dépend de la précision désirée sur la hauteur ou l'aire du pic ainsi que de la stabilité à moyen terme de la ligne de base (λ est généralement compris entre 2 et 5).

.../...

On a alors :

$$C_{max} = \lambda \frac{G}{S} \qquad \text{IV-1}$$

C_{max} étant la concentration minimale du soluté au sommet du pic permettant la détection.

La limite de détection totale, m_D, est la quantité minimale en poids de soluté devant être injectée pour permettre la détection.

En combinant les équations I-38 et IV-1, on a donc :

$$m_D = \frac{\lambda \sqrt{2\pi} V_R G}{\sqrt{N} S} \qquad \text{IV-2}$$

Cette limite dépend donc non seulement des caractéristiques du détecteur (G,S) mais également de V_R et N, caractéristiques liées au fonctionnement de la colonne.

Par conséquent définir une limite de détection d'un détecteur répondant à la concentration par la quantité minimale détectable d'un soluté n'a aucun sens si on ne spécifie pas les caractéristiques de transfert du soluté dans la colonne.

Le Tableau I de l'Annexe IV donne les limites de détection de quelques détecteurs en fonction de différentes unités de concentration.

Remarque : pour un détecteur répondant au débit massique du soluté, comme par exemple le détecteur à ionisation de flamme, le spectromètre de masse ou les compteurs de radioactivité, la sensibilité S' est définie comme sa réponse en millivolt à un changement unitaire de débit massique (exprimé en g/sec). Comme celui-ci est en fait égal au produit de la concentration par le débit volumique Q, lorsque Q est constant, la limite de détection totale est alors égale à :

$$m'_D = \frac{\lambda \sqrt{2\pi} t_R G}{\sqrt{N} S'} \qquad \text{IV-3}$$

.../...

Cependant, les parties 2,3 et 4 seront consacrées seulement aux détecteurs sensibles à la concentration.

IV - 2. DILUTION GENERALE DANS LA COLONNE

Si C_o est la concentration en soluté de l'échantillon injecté, le rapport $\frac{C_o}{C_{max}}$ représente la dilution subie par le soluté au cours de son passage dans la colonne. Lorsque C_o est fixé pour une des raisons invoquées précédemment, augmenter la réponse du détecteur revient à diminuer la dilution.

Si V_o est le volume d'échantillon injecté, la masse m du soluté injecté est alors :

$$m = C_o V_o \qquad \text{IV-4}$$

L'équation I-38 permet alors d'écrire :

$$\frac{C_o}{C_{max}} = \frac{V_R \sqrt{2\pi}}{V_o \sqrt{N}} \qquad \text{IV-5}$$

Alternativement, on peut également écrire à l'aide des équations I-24, I-25 et I-33 :

$$\frac{C_o}{C_{max}} = \frac{\pi \sqrt{2\pi}}{4} \frac{\epsilon_{tot} d_c^2}{V_o} (1 + k') \sqrt{L} \sqrt{H} \qquad \text{IV-6}$$

La dilution sera donc d'autant plus faible que le volume de rétention du soluté sera faible, l'efficacité grande et le volume injecté important. Par exemple, pour un soluté ayant un k' de 2, la dilution dans une colonne de 25 cm de longueur et de 4 mm de diamètre intérieur fournissant 2500 plateaux théoriques est égale à 95 si l'on injecte 5 µl d'échantillon.
L'étude de l'influence des paramètres de la colonne sur la dilution peut alors être traitée comme l'ont été les problèmes

.../...

d'optimisation étudiés Chapitre III. On peut donc écrire $\frac{C_o}{C_{max}}$ en fonction de trois variables indépendantes et étudier l'influence de chacun d'eux en maintenant les deux autres constantes. Si l'on se souvient que H est une fonction de u, de d_p et de quelques paramètres secondaires, l'équation IV-6 exprime alors $\frac{C_o}{C_{max}}$ en fonction des variables indépendantes L, u et d_p.

A vitesse et diamètre des particules constants (donc H constant), la dilution varie comme $\sqrt{L}$. Elle sera donc d'autant plus faible que la colonne sera plus courte.

Si l'on maintient constants L et d_p (la colonne est alors fixée), la dilution varie avec la vitesse comme $\sqrt{H}$ .Elle présente donc un minimum en fonction de u. Par conséquent, dans le domaine usuel de travail en chromatographie en phase liquide (partie croissante de la courbe de HEPT), la dilution est d'autant plus faible que la vitesse est faible ou, puisque t_R est inversement proportionnel à u, que le temps de rétention est élevé. Dans ce cas, le temps d'analyse est alors le prix payé pour l'amélioration de la détection.

Enfin, si l'on maintient L et u constant, la dilution diminue quand d_p diminue, puisqu'alors, H décroît fortement (eq. I-39 à I-48 ou I-49). Mais ce cas n'a pas grande signification dans la pratique.

Le volume V_o que l'on peut injecter dans la colonne est proportionnel à la quantité de phase stationnaire. Il varie donc comme le carré du diamètre de la colonne, d_c. Alors, d'après l'équation IV-6, ce diamètre est sans effet sur la dilution. Si, cependant, on ne dispose que d'un volume limité d'échantillon, un tube étroit contribue alors fortement à diminuer la résolution, dans la mesure toutefois où V_o est suffisamment faible pour que la contribution de l'injection à l'élargissement des pics soit négligeable et que la colonne ne soit pas surchargée.

.../...

La variation de la dilution avec le facteur de capacité est difficile à prédire car H ne varie pas d'un façon simple avec k'. Cependant, étant donné que, si H décroît lorsque k' augmente cette décroissance est pratiquement toujours moins forte que celle de la fonction $1/(1 + k')^2$ (voir chapitre I), il résulte de l'équation IV-6 que la dilution augmente toujours avec k'.

IV - 3. DILUTION ET RESOLUTION

Dans l'étude qui précède, le nombre de plateaux théoriques n'était pas maintenu constant, aussi la résolution variait. On a noté qu'un compromis devait être trouvé entre l'amélioration de la dilution et celle de la résolution. On peut alors étudier la variation de la résolution à dilution constante ou bien celle de la dilution à résolution constante. Ce dernier type d'optimisation est probablement plus significatif dans la pratique. On cherche à écrire $\frac{C_o}{C_{max}}$ en fonction de R_S et de deux variables indépendantes. En combinant les équations I-24, I-25, I-33, I-36 et IV-5, on obtient les deux relations suivantes :

$$\frac{C_o}{C_{max}} = \frac{\pi\sqrt{2\pi}}{16} \cdot \frac{\epsilon_{tot} \cdot d_c^2}{V_o} \cdot k' \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{L}{R_S} \qquad \text{IV-7}$$

$$\frac{C_o}{C_{max}} = \pi\sqrt{2\pi} \frac{\epsilon_{tot}\, d_c^2}{V_o} \cdot \frac{(1 + k')^2}{k'} \cdot \frac{\alpha}{\alpha - 1} \cdot R_S\, H \qquad \text{IV-8}$$

On remarque que les équations IV-7 et IV-8 expriment la dilution en fonction de deux paramètres indépendants. Le système de variables principales choisies ayant trois degrés de liberté, on pourra donc choisir un autre paramètre indépendant.

L'équation IV-7 montre que la dilution à résolution constante sera d'autant plus faible que la colonne sera courte.

.../...

De même, l'expression de H en fonction de u et de d_p montre que la dilution diminue - à vitesse constante - lorsque la taille des particules décroît .

Lorsque la colonne est fixée, la dilution à résolution constante varie dans la même proportion que H lorsque u varie, d'où l'avantage de travailler au minimum de la courbe de HEPT.

On note également, avec les mêmes réserves que dans la partie IV-2, que le diamètre de la colonne n'a pas d'influence sur la dilution.

La variation de $\frac{C_o}{C_{max}}$ avec k' dépend de celle de H avec k'. Cependant, dans ce cas, contrairement au précédent, on ne peut prédire une tendance de variation, puisque celle-ci peut être continûment croissante, constante ou bien peut présenter un minimum (voir annexe IV).

L'équation IV-8 indique également que si l'on maintient H constant (soient u et d_p constants par exemple), à résolution constante, la dilution est d'autant plus faible que la sélectivité α est grande. Cela provient de ce que pour conserver la résolution à une valeur correcte (2 par exemple), on peut alors diminuer la longueur de la colonne.

Remarque : L'équation IV-7 indique que si l'on augmente la résolution en maintenant constante la longueur de la colonne, la dilution diminue. En fait, cela ne peut se faire qu'en jouant sur un autre paramètre, soit par exemple, diminuer la vitesse. Dans ce cas, le temps de rétention est alors augmenté. Il peut être intéressant alors d'étudier la variation de la dilution à résolution et temps d'analyse donnés, ce qui est un problème assez fréquemment rencontré dans la pratique.

.../....

IV - 4. DILUTION, RESOLUTION ET TEMPS D'ANALYSE

Se fixer t_R et R_S (ou N) revient, on l'a vu, à déterminer une analyse. L'équation IV-7 permet alors de discuter l'influence des divers paramètres à l'aide des conclusions tirées dans la partie III-3 et notamment des figures A.II-1 et A.II-2, si l'on considère L comme une fonction de t_R.

L'équation IV-7 montre tout d'abord que la dilution varie proportionnellement à la longueur de la colonne et au carré de son diamètre avec les hypothèses déjà faites. Il est bon de rappeler que le volume injecté est conservé constant sans qu'il n'y ait de contribution sensible de l'injection à l'élargissement des zones, ni de surcharge de la colonne.
On peut alors déduire des figures A.II-1 et A.II-2 que, dans le domaine usuel de travail (parties croissantes de ces courbes), $\frac{C_o}{C_{max}}$ diminue quand le diamètre des particules décroît, de même que la pression, d'où tout l'intérêt alors de travailler au minimum de la courbe de HEPT. La longueur de la colonne correspondant au minimum de la pression nécessaire pour effectuer l'analyse étant environ égale à deux fois la longueur minimale (qui correspond alors à une pression infinie, voir Annexe II), la dilution $\left(\frac{C_o}{C_{max}}\right)_{opt}$ obtenue en travaillant à cette pression minimale n'est que deux fois plus élevée environ que la dilution minimale que peuvent subir les solutés au cours de l'analyse. Cette dilution à l'optimum est donnée par la relation suivante (eq. I-24, I-25, III-13 et IV-5):

$$\left(\frac{C_o}{C_{max}}\right)_{opt} = \frac{\pi\sqrt{2\pi}}{4} \frac{\varepsilon_{tot}\, d_c^2}{V_o} \sqrt{h_{min}\, \nu_{opt}\, D_m\, t_R (1+k')} \qquad \text{IV-9}$$

Il est remarquable que cette dilution ne dépende pas du nombre de plateaux théoriques, le volume de rétention étant, à l'optimum,

.../...

proportionnel à $\sqrt{N}$ (eq. II-13) et qu'elle est d'autant plus faible que l'analyse sera rapide. La figure 8 représente la courbe de variation de la dilution avec le temps d'analyse lorsqu'on travaille à l'optimum en injectant 5 µl d'échantillon; les valeurs numériques sont celles qui ont été utilisées dans les exemples précédents (ε_{tot} = 0,85; d_c = 4 mm; D_m = 3,5 x 10^{-5} cm^2/sec; k' = 2; h_{min} = 3,14; ν_{opt} = 2,15). Le point limite correspond au cas où la perte d'efficacité provoquée par l'injection devient supérieure à 1 % (voir paragraphe IV-5).

Le véritable prix à payer pour améliorer la détection dans ce cas est à chercher dans la pression nécessaire pour travailler au minimum (eq.III-12).
Par ailleurs, l'équation IV-9 pourrait laisser croire que l'on peut obtenir une valeur de $\left[\left(\frac{C_o}{C_{max}}\right)\right]_{opt}$ aussi faible que l'on veut en diminuant par exemple le temps d'analyse ou le diamètre de la colonne. Bien entendu, il est illusoire d'espérer atteindre des valeurs de $\left(\frac{C_o}{C_{max}}\right)$ inférieures à 1, ce qui reviendrait à concentrer les solutés en même temps qu'on les sépare. En fait, lorsqu'on travaille à l'optimum, diminuer t_R (ce qui revient à diminuer L) ou d_c entraîne une diminution du volume de rétention et par conséquent du volume maximal que l'on peut injecter sans apporter une contribution importante à l'élargissement des zones.

IV - 5. INFLUENCE DU VOLUME INJECTE

Un soluté de facteur de capacité k', injecté dans un volume V_o d'échantillon dans la colonne va occuper en tête de celle-ci un certain volume. L'injection idéale est alors l'injection piston qui déplace en tête de colonne un volume $V_o/(1 + k')$ de phase mobile sans que celle-ci se mélange avec l'échantillon. Bien sûr, un certain mélange apparaît toujours et le profil d'injection peut être exponentiel ou avoir toute autre forme élargie. Par ailleurs la tête de colonne sera très certainement surchargée en

.../...

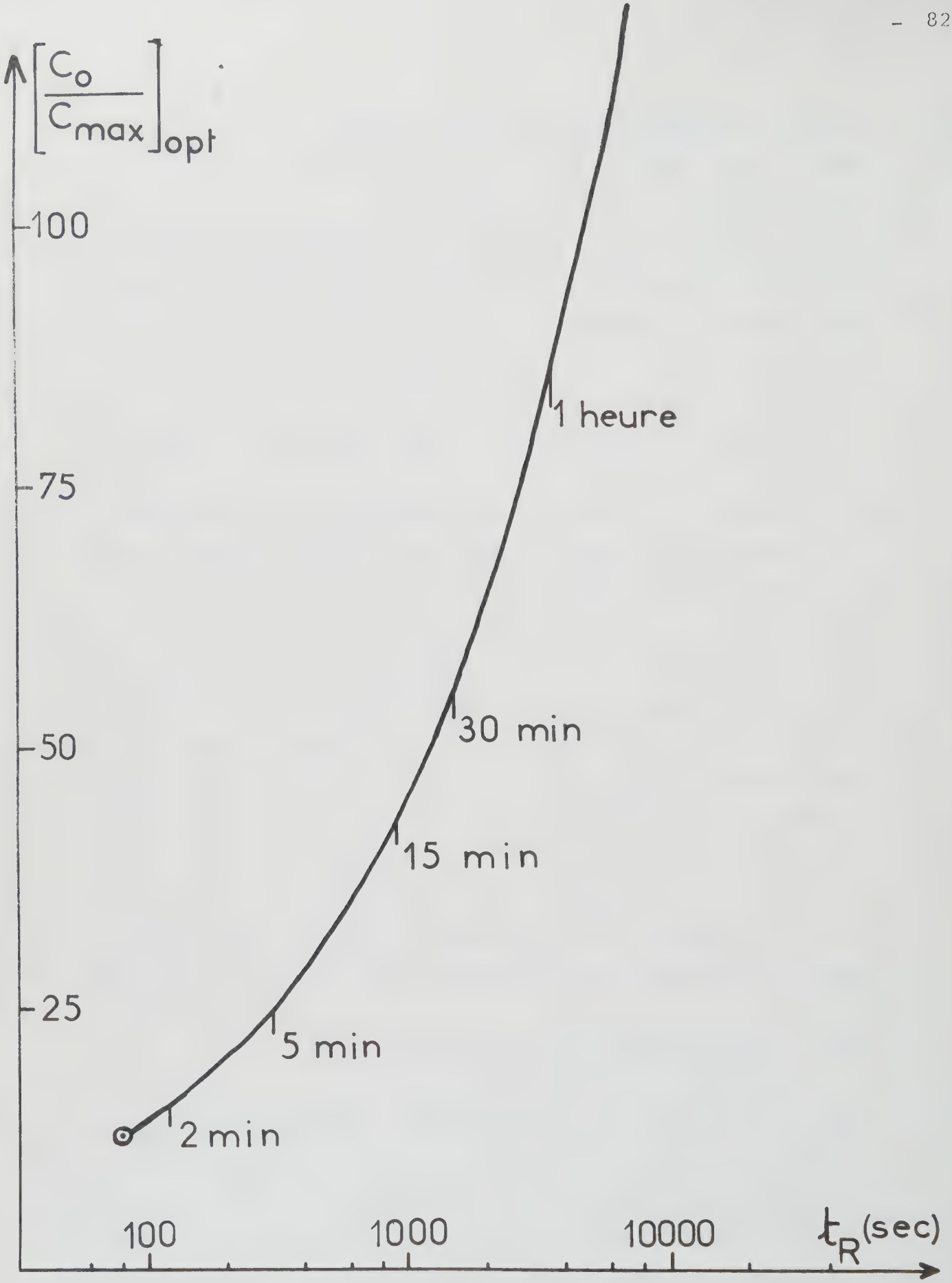


FIGURE 8

Courbe de variation de la dilution en fonction du temps d'analyse lorsqu'on travaille à l'optimum en injectant 5 µl d'échantillon (eq.IV-

soluté, de sorte qu'il n'est pas valable de considérer k' comme indépendant de l'abscisse dans la colonne. De plus, un retard à l'établissement de l'équilibre peut entraîner un déplacement de volume plus important que celui prédit, ce qui réduit d'autant la longueur effective de la colonne.

Tous ces effets illustrent combien le phénomène d'injection est complexe. Néanmoins, nous continuerons à considérer k' comme constant et la longueur de la colonne comme totalement effective en chromatographie analytique, tout en reconnaissant les limites de ces hypothèses.

Si $\sigma_{V,inj}$ représente l'écart-type volumique du profil d'injection, l'équation I-28 peut alors s'écrire :

$$\sigma^2_{V,tot} = \sigma^2_{V,inj} + \Delta(\sigma^2_V) \qquad \text{IV-10}$$

$\Delta(\sigma^2_V)$ représente toutes les contributions à la variance du pic de soluté autres que celle due à l'injection (colonne, tube de raccordement au détecteur, détecteur). $\sigma_{V,inj}$ est bien entendu d'autant plus grand que V_o est grand. C'est pourquoi certains auteurs (3-6) ont écrit que l'écart-type $\sigma_{V,inj}$ est proportionnel au volume injecté. On obtient alors :

$$V_o = K^* \sigma_{V,inj} \qquad \text{IV-11}$$

$$\sigma^2_{V,tot} = \frac{V_o^2}{K^{*2}} + \Delta(\sigma^2_V) \qquad \text{IV-12}$$

K^* étant un paramètre caractéristique de la méthode d'injection et des conditions d'injection. La meilleure valeur de K^*, la plus élevée, est obtenue pour une injection piston. On a alors : $K^* = 2\sqrt{3} \simeq 3,5$. K^* peut-être déterminé à partir de la pente des courbes $\sigma^2_{V,tot}(V_o^2)$. Les essais effectués montrent que ces

.../...

courbes sont des droites dans un large domaine de V_o. Par conséquent, l'équation IV-11 peut être considérée comme valide.

On a déduit de ces courbes expérimentales les valeurs 2,8 et 2 de K^* respectivement pour des composés ayant un k' de 0 et de 1 environ (Tableau A.IV-II). Il semble que $K^* = 2$ soit une valeur moyenne en chromatographie en phase liquide pour des injections faites à la seringue directement en tête de colonne, ce que confirme une mesure effectuée à partir de la courbe tracée par HUBER, HULSMAN et MEIJERS (figure 2, réf.6).

Ceci permet de déterminer la valeur maximale du volume que l'on peut injecter si l'on tolère une augmentation relative θ^2 de la variance, provoquée par l'injection. Alors, on a :

$$\sigma^2_{V,tot} = (1 + \theta^2)\ \Delta(\sigma^2_V) \qquad \text{IV-13}$$

soit :

$$\sigma^2_{V,inj} = \theta^2\ \Delta(\sigma^2_V) \qquad \text{IV-14}$$

Par ailleurs, les équations I-30 et IV-5 permettent d'écrire :

$$\left(\frac{C_o}{C_{max}}\right)_{min} = \frac{\sqrt{2\pi}\ \sigma_{V,tot}}{V_{o,max}} \qquad \text{IV-15}$$

Si θ est suffisamment petit pour que l'on puisse négliger $\sigma^2_{V,inj}$ devant $\Delta(\sigma^2_V)$, on a alors :

$$\left(\frac{C_o}{C_{max}}\right)_{min} = \frac{\sqrt{2\pi}}{\theta K^*} \qquad \text{IV-16}$$

Il est remarquable que la dilution minimale que l'on obtient en injectant le volume maximal tolérable soit indépendante des conditions chromatographiques, pourvu que K^* soit constant. Avec la valeur moyenne de K^* déterminée, si l'on accepte une augmentation de 1 % de la variance, soit approximativement une diminution

.../...

de 1 % du nombre de plateaux théoriques, alors θ vaut 0,1 et la dilution minimale obtenue est de 12,5.

Si θ^2 est petit, alors les équations I-30, IV-11 et IV-14 permettent de déterminer $V_{o,max}$ en fonction des conditions chromatographiques :

$$V_{o,max} = \frac{\theta K^* V_R}{\sqrt{N}} \qquad \text{IV-17}$$

Si $V_R = 10\ cm^3$ et $N = 2500$, alors on a : $V_{o,max} = 40\ \mu l$, si $\theta = 0.1$ et $K^* = 2$, ce qui est nettement supérieur aux valeurs des volumes habituellement injectés.

Dans le cas où l'on travaille au minimum de la courbe de HEPT, soit dans les conditions optimales permettant d'obtenir une analyse donnée, ce volume peut être déterminé en égalisant les équations IV-9 et IV-16 :

$$V_{o,max} = \frac{\theta K^* \pi}{4} \cdot \varepsilon_{tot} d_c^2 \sqrt{\frac{h_{min} \nu_{opt} D_m t_R}{(1+k')}} \qquad \text{IV-18}$$

Les équations IV-17 et IV-18 présentent un intérêt certain puisqu'elles permettent de déterminer le volume maximal que l'on peut injecter compatible avec une perte relative donnée du nombre de plateaux théoriques. Cependant, leur emploi est limité dans la mesure où il n'existe dans la littérature scientifique que très peu de données concernant la valeur du coefficient K^*. D'après les quelques mesures effectuées, il semble que $K^* = 2$ constitue une valeur moyenne qui permet une évaluation, sinon exacte, tout au moins approximative de $V_{o,\ max}$, compte-tenu des caractéristiques chromatographiques.

.../...

Remarque : Les déterminations de K^+ effectuées en chromatographie en phase gazeuse montrent que $K^+ = 2$ est également une valeur moyenne, si l'on compare la variance totale et le carré du volume injecté dans des mêmes conditions de température et de pression (Tableau IV-III). Bien entendu, cette technique est désavantagée par rapport à la chromatographie en phase liquide à cause de la différence de densité et de compressibilité entre un gaz et un liquide, si l'on exprime le volume injecté dans les conditions d'injection. En effet, si l'échantillon injecté est liquide, il est rapidement vaporisé dans l'injecteur ou en tête de colonne, s'il est gazeux, il subit une variation de volume qui dépend des rapports de pression et de température absolue entre l'entrée de la colonne et les conditions ambiantes.

BIBLIOGRAPHIE - CHAPITRE IV

(1) J.J. KIRKLAND, Gas Chromatography 1972, Montreux, S.G. Perry ed., Applied Science Publ., London (1972) p.39.

(2) J.J. DE STEFANO, H.C. BEACHELL, J. Chrom. Sci., 10, 654 (1972)

(3) E. GLUECKAUF, Trans. Faraday Soc., 51, 34 (1955)

(4) L.W. HOLLINGSHEAD, H.W. HABGOOD, W.E. HARRIS, Can. J. Chem. 43, 1560 (1965)

(5) J.C. STERNBERG, Advances in Chromatography, ed. J.C. Giddings, R.A. Keller ed., 2, 205 (1966)

(6) J.F.K. HUBER, J.A.R.J. HULSMAN, C.A.M. MEIJERS, J. Chromatog., 62, 79 (1972)

CHAPITRE V

APPAREILLAGE ET PROBLEMES ASSOCIES A L'OBTENTION D'ANALYSES PERFORMANTES

L'appareillage utilisé en chromatographie en phase liquide moderne se distingue assez nettement de celui employé dans la version classique de cette méthode et présente quelques analogies avec un chromatographe en phase gazeuse, comme le montrera la première partie de ce chapitre. Bien que la tendance actuelle soit de travailler au minimum de la courbe de HEPT, à des pressions relativement faibles, cette distinction entre les deux versions de la chromatographie en phase liquide se trouve renforcée par la nécessité d'éviter une contribution importante de l'appareillage à l'élargissement des zones. Les conditions que doit remplir celui-ci seront étudiées dans la seconde partie. Dans la troisième, les diverses techniques utilisées pour remplir les colonnes seront décrites. Enfin, dans la dernière partie, quelques mots seront dits sur le problème de l'injection dans les colonnes hautement performantes de chromatographie en phase liquide.

V - 1. DESCRIPTION DE L'APPAREILLAGE UTILISE

Le schéma de l'appareillage est exposé sur la figure 9. Il se compose principalement d'un réservoir de liquide vecteur, d'une pompe permettant de refouler celui-ci sous pression, d'un régulateur de pression, d'un dispositif d'injection, de la colonne et du détecteur. Les caractéristiques générales de ces éléments ont été exposées (1).

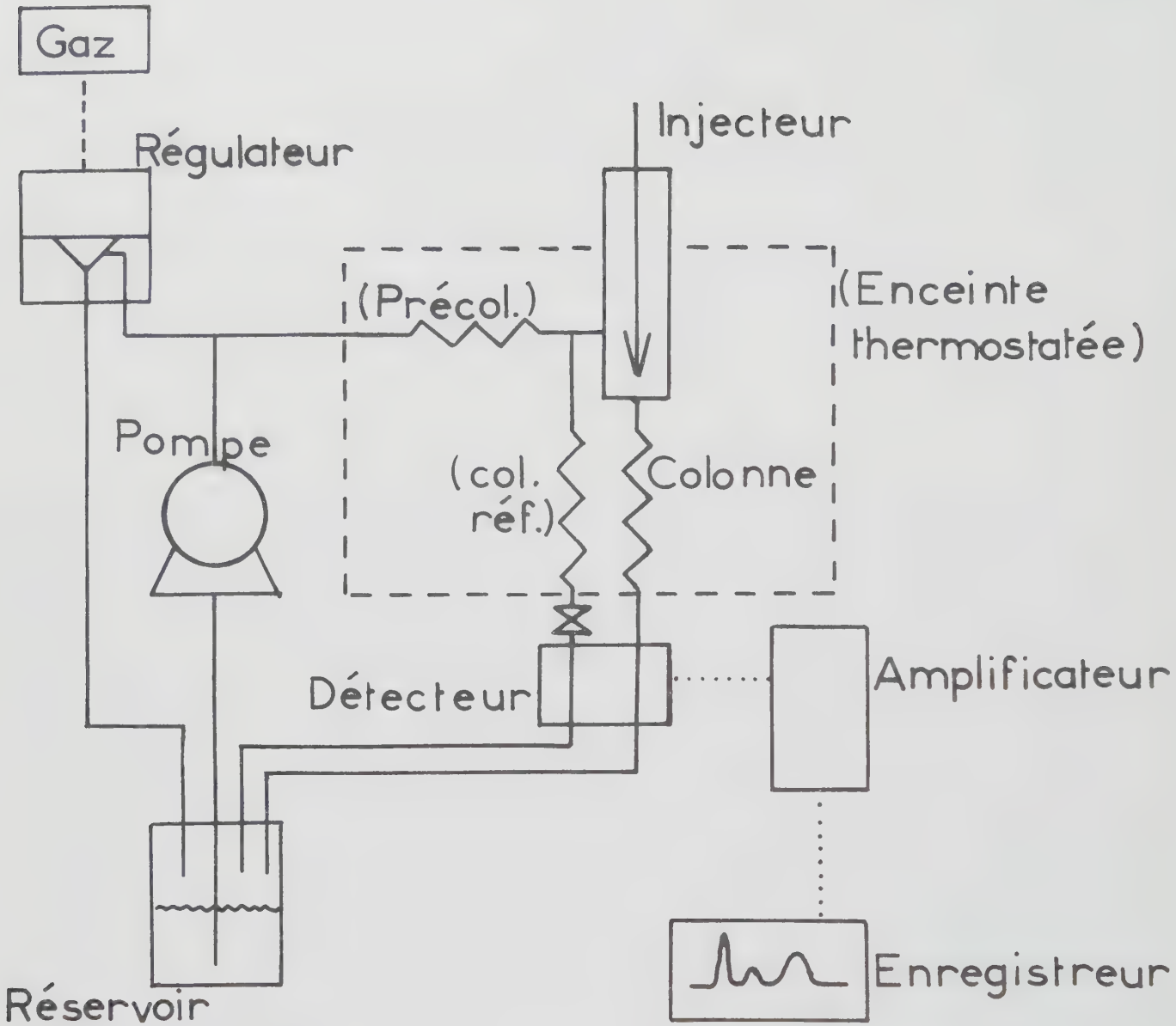


FIGURE 9

Représentation schématique de l'appareillage utilisé

Le réservoir de liquide vecteur que nous utilisons est un récipient en verre, le liquide contenu y est maintenu autant que possible à l'abri du contact de l'air pour éviter surtout que s'y dissolvent l'eau et le gaz carbonique qu'il contient. En effet, de nombreux déboires résultent de l'emploi de phases mobiles dont la teneur en eau n'est pas contrôlée avec des adsorbants comme le gel de silice ou le gel d'alumine (2).

Dans toute cette étude, nous avons utilisé une pompe ORLITA, de type M 3 S 4/4 (Giessen/Lahn, Allemagne de l'Ouest). Elle comporte trois têtes. Dans chacune d'elles, un piston se déplace avec une fréquence de 100 à 120 coups par minute, dans un compartiment d'huile séparé de celui du liquide vecteur par une membrane en acier inoxydable. Le piston possède un mouvement sinusoïdal déphasé à 120 ° de celui des deux autres têtes. Le volume maximal pouvant être déplacé à chaque coup de piston est de 0,11 cm^3, cependant il est fonction de la longueur de la course du piston et de la pression. La pression maximale autorisée est de 325 atmosphères. Le débit du liquide délivré par une tête de pompe est fortement pulsé. Le couplage des trois têtes de pompe ne réduit qu'insuffisamment les pulsations, de sorte qu'un amortisseur de pulsations annexe est nécessaire pour assurer la constance du débit.

Le dispositif d'amortissement utilisé, analogue à celui décrit par DEININGER et HALASZ (3), est placé en dérivation par rapport au circuit principal du liquide. Il se compose d'un compartiment contenant du gaz à une pression constante séparé par une membrane du compartiment de liquide. Lorsque la pression du liquide est supérieure à celle du gaz, la membrane se soulève et un pointeau solidaire de celle-ci libère l'évacuation du liquide en excès qui retourne alors dans le réservoir. Cet amortisseur de pulsations agit donc comme un régulateur de pression puisque la pression du liquide est égale à celle du gaz et également comme un dispositif de sécurité évitant toute surpression qui pourrait provenir d'un bouchage éventuel du circuit de liquide. La constance du débit est alors assurée avec une précision meilleure que 1%, même si l'on n'utilise qu'une seule tête de pompe au maximum de la course du piston.

.../...

L'injecteur est schématisé sur la figure 1 de l'annexe IV. Il permet l'injection directe à la seringue en tête de colonne à travers un septum en Viton (IMPERVIA, Courbevoie), élastomère synthétique résultant de la copolymérisation du fluorure de vinylidène et d'hexafluoropropylène, qui résiste à la plupart des solvants à l'exception des cétones. Bien que ce matériau soit souple, la répétition des injections entraîne un détachement de fines particules, l'aiguille de la seringue agissant en quelque sorte comme un emporte-pièce, ce qui oblige à remplacer la pastille après une centaine d'injections en moyenne. Nous avons utilisé des seringues HAMILTON 701 N pour des injections sous moyenne pression et HP 305 pour les plus fortes pressions.

Les colonnes, longues de 1 à 4 m, utilisées au début de ce travail, étaient en général enroulées en spirales de 20 à 25 cm de diamètre, ce qui nuisait peu à leur efficacité (4). Par contre, pour les colonnes courtes (6 cm de longueur) utilisées plus récemment, la disposition linéaire s'impose pour limiter l'élargissement des bandes. Ces dernières ont un diamètre intérieur plus large que les précédentes (4,0 ou 4,7 mm au lieu de 1,6 ou 2,2 mm). L'acier inoxydable a été préféré au cuivre pour éviter les problèmes de corrosion qui surgissent avec ce dernier matériau, même avec un solvant aussi peu miscible avec l'eau que le n-heptane. On a, en effet, constaté que l'alumine contenue dans une colonne en cuivre prenait une teinte vert-de-gris après percolation de ce solvant.

Nous avons utilisé les deux détecteurs les plus couramment employés en chromatographie en phase liquide (5) : photomètre à absorption de la lumière ultraviolette à 254 nm émise par une lampe à vapeur de mercure basse pression (Uvicord 1, LKB, Stockholm, Suède) dont la cellule a été modifiée pour réduire son volume à 6 µℓ et réfractomètre différentiel (R4 ou R 401, Waters Associates, Milford, Etats-Unis). Pour travailler à la limite de sensibilité de ce détecteur (de l'ordre de 10^{-7} unité d'indice de réfraction), il est indispensable de thermostater efficacement le bloc de détection, de sorte que la différence de température entre les

deux cellules (mesure et référence) ne dépasse pas quelques 10^{-3}°C. On y parvient à l'aide d'un thermostat HAAKE (Berlin, Allemagne de l'Ouest) permettant de pomper un liquide dont la température est régulée à environ 10^{-2}°C. La nécessité de faire percoler l'effluent de colonne dans un tube échangeur de chaleur situé avant la cellule augmente le volume mort du détecteur qui est environ de 30 µℓ pour le réfractomètre R 401 et de 350 µℓ pour le réfractomètre R 4. On a parfois couplé en série le photomètre UV placé directement en sortie de colonne et le réfractomètre R 4, pour accroître les possibilités de détection des mélanges inconnus. Dans les conditions d'utilisation le nombre de plateaux théoriques mesuré sur un enregistreur à double piste était plus grand avec le second détecteur. Ce résultat, a priori surprenant, provient de ce que l'augmentation relative du temps de "rétention", due au passage du soluté dans l'échangeur de chaleur, était supérieure à celle de la variance, mais la meilleure résolution était bien entendu obtenue pour le premier détecteur.

Le signal du détecteur est visualisé par un enregistreur potentiométrique. Le liquide provenant du détecteur peut être recyclé dans le réservoir, tant que la proportion des solutés dans le liquide vecteur reste faible (quelques ppm). A l'exception des raccords de la pompe et des colonnes, on a utilisé pour le circuit de liquide, des raccords SWAGELOK (Crawford Fittings Company, Solon, Etats-Unis) qui s'avèrent satisfaisants, tant que la pression ne dépasse pas 300 bars.

V - 2. LIMITATIONS DUES A L'APPAREILLAGE

Le coeur d'un chromatographe en phase liquide est bien entendu la colonne où s'effectue la séparation. Cependant, pour que celle-ci ait lieu et puisse être visualisée, l'échantillon doit être injecté et traverser le détecteur ainsi que les éventuels tubes de raccordements de la colonne à l'injecteur et au détecteur, dont le signal est envoyé sur un enregistreur. Ces différents éléments

avec lesquels les solutés sont en contact peuvent élargir les bandes et par conséquent affecter la résolution. Les conditions qu'ils doivent remplir pour être compatibles avec les performances de la colonne sont étudiées dans l'annexe V. On va ici résumer ces conditions. On opère comme cela a été fait dans la dernière partie du Chapitre IV, en écrivant pour chaque élément que la variance additionnelle de cet élément X doit être au plus égale à une fraction θ^2 de celle obtenue dans la colonne ; soit d'après les équations I-30 et I-31 :

$$\sigma^2_{V,X} \leq \theta^2 \, \sigma^2_{V,col} = \theta^2 \, \frac{V_R^2}{N} \qquad V\text{-}1$$

$$\sigma^2_{t,X} \leq \theta^2 \, \sigma^2_{t,col} = \theta^2 \, \frac{t_R^2}{N} \qquad V\text{-}2$$

Dans les exemples numériques qui suivront, on prendra $\theta^2 = 0{,}01$, ce qui correspond à 1% de perte tolérée du nombre de plateaux théoriques.

V - 2,1. Effet du volume d'échantillon

Cet effet a, en fait, été étudié au chapitre précédent. Les équations IV-17, I-24 et I-25 fournissent une expression du volume maximal que l'on peut injecter :

$$V_{o,max} = \theta K^* \, \frac{\pi}{4} \, d_c^2 \, \varepsilon_{tot} \, (1 + k') \frac{L}{\sqrt{N}} \qquad V\text{-}3$$

Ce volume, beaucoup plus grand que ceux usuellement injectés dans les colonnes conventionnelles, décroit quand on emploie des colonnes courtes efficaces. Pour une colonne de 4 mm de diamètre intérieur, longue de 5 cm, fournissant 5000 plateaux théoriques pour un composé ayant un facteur de capacité égal à 2, ce volume devient à peine supérieur à 5 µℓ, ce qui est encore très acceptable.

Il faut noter que le temps pendant lequel ce volume est injecté a également une importance. L'expression du temps maximal d'injection $t_{o,max}$ est obtenue par une équation analogue à l'équation IV-17 pour le volume :

$$t_{o,max} = \frac{\theta \, K^* \, t_R}{\sqrt{N}} \qquad V\text{-}4$$

Si le soluté précédent est élué en 5 minutes, il doit être injecté en moins de 0,85 seconde, ce qui est relativement aisé à basse ou moyenne pression, mais devient plus difficile sous haute pression (supérieure à 100 bars).

V - 2,2. Effet des tubes de connexion

Dans un tube vide droit, l'élargissement des bandes est provoqué d'une part par la diffusion moléculaire longitudinale, d'autre part par l'existence d'un profil parabolique de vitesse dans une section droite du tube (profil de POISEUILLE) si l'écoulement est laminaire,ce qui est pratiquement toujours le cas en chromatographie analytique (l'écoulement laminaire correspond à un nombre de Reynolds inférieur à 2100 environ). L'expression de la HEPT dans un tel tube est donnée par l'équation de GOLAY (5) :

$$H = \frac{2 D_m}{u_{tc}} + \frac{r^2 \, u_{tc}}{24 \, D_m} \qquad V\text{-}5$$

u_{tc} est ici la vitesse moyenne dans le tube vide, cylindrique, de longueur ℓ et de rayon r. La variance volumique $\sigma^2_{V,tc}$, correspondant à l'équation V-5, est alors égale à :

$$\sigma^2_{V,tc} = \frac{2\pi^3 \, D_m \, r^6 \ell}{Q} + \frac{\pi \, r^4 \, \ell \, Q}{24 \, D_m} \qquad V\text{-}6$$

Les valeurs de D_m et de r étant faibles, le premier terme du membre de droite, lié à la diffusion longitudinale, est négligeable. Il en résulte en combinant les équations V-1 et V-6 que les

.../...

dimensions r et ℓ du tube doivent remplir la condition suivante :

$$r^4 \ell \leq \frac{24\ \theta^2\ D_m}{\pi} \cdot \frac{1}{\Omega} \cdot \frac{V_R^2}{N} \qquad V\text{-}7$$

soit encore :

$$r^4\ \ell\ \leq 6\ \theta^2\ \varepsilon_{tot}\ d_c^2\ (1 + k')\ D_m L\ \frac{t_R}{N} \qquad V\text{-}8$$

Ces équations montrent qu'il est bien préférable d'utiliser un tube long et étroit plutôt qu'un tube large et court de même volume. Avec les valeurs numériques précédentes, un tube de 25 cm de longueur et de 0,2 mm de diamètre intérieur, ce qui est en général très largement suffisant pour relier les colonnes au détecteur, sera satisfaisant, alors qu'un tube de 0,5 mm de diamètre intérieur ne devra pas dépasser 6,4 mm de longueur.

L'influence du tube de raccordement sur l'élargissement des zones sera donc en général faible. Cependant, une perte d'efficacité relativement importante peut provenir de la transition entre une colonne large et un tube étroit. L'étude de la forme optimale de cette section n'a pas encore été entreprise. Il est probable qu'un cône contenant un remplissage inerte (7) soit adéquat pour réduire l'effet néfaste du mauvais balayage de certaines zones de la colonne.

V - 2,3. Effet du volume du détecteur

Selon sa forme, la cellule du détecteur peut être considérée comme un tube de connexion, auquel cas les équations V-7 et V-8 s'appliquent, ou bien comme un chambre de mélange. Dans ce dernier cas qui est, en général, le plus défavorable, la contribution à la variance s'écrit (8) :

$$\sigma^2_{V,det} = V^2_{det} \qquad V\text{-}9$$

Du point de vue de l'élargissement des zones, le volume du détecteur, V_{det}, est alors analogue au volume injecté si l'on prend

.../...

$K^+ = 1$ (équation IV-11). Par conséquent, pour limiter cet élargissement, le détecteur devra remplir une condition analogue à celle de l'injection, donnée par l'équation V-3 :

$$V_{det,max} = \theta \frac{\pi}{4} d_c^2 \varepsilon_{tot}(1 + k') \frac{L}{\sqrt{N}} \qquad V\text{-}10$$

$V_{det,max}$ devra donc être approximativement deux fois inférieur à $V_{o,max}$. Par conséquent, la quasi totalité des détecteurs actuellement commercialisés est inadaptée à l'obtention de hautes performances.

V- 2,4. Effet de la constante de temps du détecteur

Le détecteur doit pouvoir donner un signal qui n'élargit pas et ne déforme pas le pic. Le temps de réponse du détecteur doit donc être faible en comparaison de la largeur du pic. La plupart des détecteurs pouvant être assimilés à des systèmes du premier ordre, ils seront caractérisés par une constante de temps τ . On montre alors (9, 10) que le profil du pic enregistré est plus large que celui du pic dans le détecteur par un facteur $(1 + \tau/\sigma_t)$ si ce facteur est inférieur à environ 1,2. Pour que la perte apparente d'efficacité soit inférieure à θ^2, τ doit donc être inférieur à τ_{max} donné par :

$$\tau_{max} = \theta \frac{t_R}{\sqrt{N}} \qquad V\text{-}11$$

Pour l'analyse précédente (5000 plateaux en 5 minutes), la perte d'efficacité sera inférieure à 1 % si la constante de temps du détecteur est inférieure à 0,4 seconde. Pour des analyses plus performantes encore, la perte d'efficacité sera sensiblement plus importante puisque la plupart des détecteurs couramment utilisés ont une constante de temps comprise entre 0,5 et 3 secondes (5).

Ce problème apparaît donc comme le plus sérieux à l'heure actuelle. Ceci accentue la position de faiblesse du détecteur dans un chro-

matographe en phase liquide, déjà soulignée au Chapitre IV en ce qui concerne la sensibilité.

La constante de temps provient ou bien de l'électronique ou bien de l'hydrodynamique de la cellule. Lorsque celle-ci agit comme une chambre de mélange, la constante de temps ne peut alors pas être inférieure à V_{det}/Q. Si cet effet est déterminant, il a déjà été considéré dans le paragraphe précédent relatif au volume du détecteur.

Il faut noter que dans le cas où l'électronique impose la constante de temps du détecteur, le pic enregistré est plus large que le pic réel circulant dans la cellule. Cet effet doit être pris en considération si l'on désire commander la collecte de l'effluent de la colonne à partir du chromatogramme.

V - 2,5. Effet de la non-linéarité de réponse du détecteur

Lorsque la réponse du détecteur n'est pas linéaire, le pic enregistré est plus petit et apparaît plus large. Le nombre de plateaux théoriques calculé à partir du second moment du pic mesuré sur le chromatogramme est alors inférieur à celui fourni par la colonne. Dans le cas où la réponse y du détecteur en fonction de la concentration C du soluté est du type parabolique :

$$y = k\ (C - aC^2) \qquad \text{V-12}$$

on montre (11) que, si a est petit, h étant la hauteur que le pic aurait si le détecteur était linéaire, cette perte relative du nombre de plateaux théoriques est :

$$\frac{\Delta N}{N} = 0{,}4\ \frac{h - y}{h} = 0{,}4\ \frac{ah}{k} \qquad \text{V-13}$$

Il est donc prudent d'effectuer les mesures dans le domaine de linéarité du détecteur, ce qui est particulièrement important pour les absorptiomètres U.V., non munis d'un amplificateur logarithmique, dont la réponse obéit à la loi de BEER-LAMBERT.

V - 2,6. Effet global de l'appareillage

Le volume injecté, les tubes de connexion , le détecteur, les connexions entre ces différents éléments, contribuent à élargir les zones chromatographiques et donc à affecter la résolution obtenue dans la colonne. Leurs contributions respectives sont à additionner pour obtenir l'effet global de l'appareillage.

La constante de temps du détecteur, la non-linéarité de réponse de celui-ci, éventuellement le temps de réponse de l'enregistreur, dont les contributions sont aussi à additionner, déforment fictivement sur le chromatogramme le profil de concentration du pic à la sortie de la colonne.

De tous ces effets, les plus critiques concernent le détecteur. Il devient impossible, à l'heure actuelle, de mesurer correctement les performances des colonnes très efficaces. Ainsi, on peut voir sur la figure A.V-2 une courbe HEPT obtenue avec une colonne longue de 6 cm remplie de particules de 5µm (Partisil 5-Reeve Angel -45- Ferrières) avec un détecteur à absorption U.V. et la courbe corrigée de l'effet de la constante de temps du détecteur, supposée égale à 0,4 seconde. Aux grandes vitesses, la correction devient très importante puisqu'elle s'accroît proportionnellement à u^2. La mesure du coefficient C de l'équation I-55 se trouve donc faussée.

V - 3. REMPLISSAGE DES COLONNES

De nombreuses méthodes ont été proposées pour remplir les colonnes (12). Il est cependant bien difficile d'en dégager la meilleure car elles dépendent fortement de facteurs impossibles à quantifier, liés à l'expérimentateur. Toutefois, il est généralement bien reconnu qu'une méthode sèche de remplissage peut être utilisée pour les particules relativement grosses alors qu'à quelques exceptions près (13) la méthode humide s'impose pour les plus fines.

.../...

En effet, la surface externe des particules contenues dans un volume donné varie comme l'inverse du diamètre des particules. Elle peut atteindre quelques m^2/g pour des particules de 5 µm. L'énergie de surface est alors suffisamment importante pour que les particules forment des agglomérats dont l'effet est catastrophique sur l'efficacité. Ceux-ci étant plus stables dans les gaz que dans les liquides, on préfère utiliser une méthode humide pour remplir les colonnes de fines particules.

Le point de transition entre les deux méthodes n'est pas clairement défini. Il dépend d'un certain nombre de facteurs comme par exemple la nature du remplissage (gel d'alumine, gel de silice), la forme des particules (sphériques, irrégulières), le volume poreux. On peut fixer approximativement cette transition vers 25 - 30 µm pour le gel de silice et 15 - 20 µm pour le gel d'alumine qui est plus lourd.

La méthode que nous avons utilisée pour les plus grosses particules consiste à verser dans la colonne de petites portions de garnissage correspondant à une hauteur de colonne d'1 à 2 cm environ et à frapper latéralement la colonne entre chaque versement. Lorsque la colonne est remplie, on la tape verticalement sur le sol assez énergiquement d'une hauteur de 5 cm environ, puis on complète éventuellement le haut de la colonne.

Pour les plus fines particules, nous avons employé la méthode d'équidensité (14, 15) qui consiste à mettre les particules en suspension dans un solvant de même densité. Pour les particules de Partisil 5 séchées pendant 3 heures à 120 °C,nous avons utilisé un mélange 91,7 - 8,3 (en volume) de dibromo-1,2-éthane (densité 2,18) et de benzène (densité 0,88) respectivement. La composition du mélange est testée par centrifugation : aucune sédimentation ni flottation ne doivent apparaître après 30 secondes à 2000 g. Cette suspension est alors versée dans un réservoir relié d'une part à la colonne à remplir, d'autre part, par l'intermédiaire d'une vanne d'arrêt à une pompe ORLITA MS 600/22.

.../...

On fait monter celle-ci en pression à 450 bars avec du n-heptane et l'on ouvre subitement la vanne, ce qui force la suspension à passer à travers la colonne munie d'un fritté poreux à son extrémité. Des résultats assez remarquables (voir figure 4) ont été obtenus par cette méthode après avoir vrillé l'intérieur de la colonne avec un foret, ce qui a pour effet d'éliminer les stries longitudinales provoquées par l'étirage à froid du tube. Cette méthode de remplissage, très satisfaisante pour les courtes colonnes, est applicable également aux colonnes plus longues puisque des résultats comparables à ceux de la figure 4 ont été obtenus avec une colonne de 50 cm de longueur et de 1 cm de diamètre intérieur, remplie de Partisil 5 (16).

V - 4. PROBLEME DE L'INJECTION DANS LES COLONNES COURTES TRES EFFICACES

Un survol de la littérature scientifique concernant les colonnes très efficaces remplies de fines particules (< 15 µm) montre que dans la quasi totalité des cas, les pics obtenus ne sont pas symétriques, mais ont tendance à traîner, ce qui détruit partiellement la résolution que l'on pourrait attendre de ces colonnes. L'expérience nous a montré que cette dissymétrie des pics était due en grande partie à la manière d'injecter.

Il a été trouvé que l'injection à la seringue dans le remplissage, à une profondeur de quelques millimètres, améliorait nettement l'efficacité des colonnes (17). Cependant, cette méthode ne peut être généralisée pour un travail de routine, puisqu'elle diminue considérablement la durée de vie des colonnes et des seringues.

En pratiquant des injections à la seringue en tête de colonne, immédiatement au-dessus du remplissage, au contact de celui-ci, il nous est apparu que la forme des pics dépend fortement du temps pendant lequel le soluté est injecté. Les figures 10 et 11 montrent les chromatogrammes obtenus avec une colonne (L = 12,5 cm ;

d. i. = 4,7 mm), remplie de particules de Sphérosil XOA 600 7µm (Rhône-Poulenc Industries, Neuilly-sur-Seine) pour des injections lente (environ 5 secondes) et rapide (quelques dizièmes de seconde), respectivement, d'un mélange de composés aromatiques. La dissymétrie est beaucoup plus nette pour l'injection instantanée, les pics présentant même un épaulement, comme cela a déjà été parfois noté (17). Il semble que cela résulte d'un phénomène de turbulence provoqué par l'injection qui élargit sensiblement la bande d'échantillon à l'entrée de la colonne. Par ailleurs, une injection trop lente est néfaste d'après ce qui a été étudié au paragraphe V-2,1. Le compromis, qui existe donc du point de vue du temps d'injection, dépend des conditions opératoires et de l'appareillage (colonne, vitesse, pression, seringue, injecteur), mais il est encore impossible de tirer des conclusions générales concernant l'optimum sans une étude systématique de l'influence de ces différents paramètres.

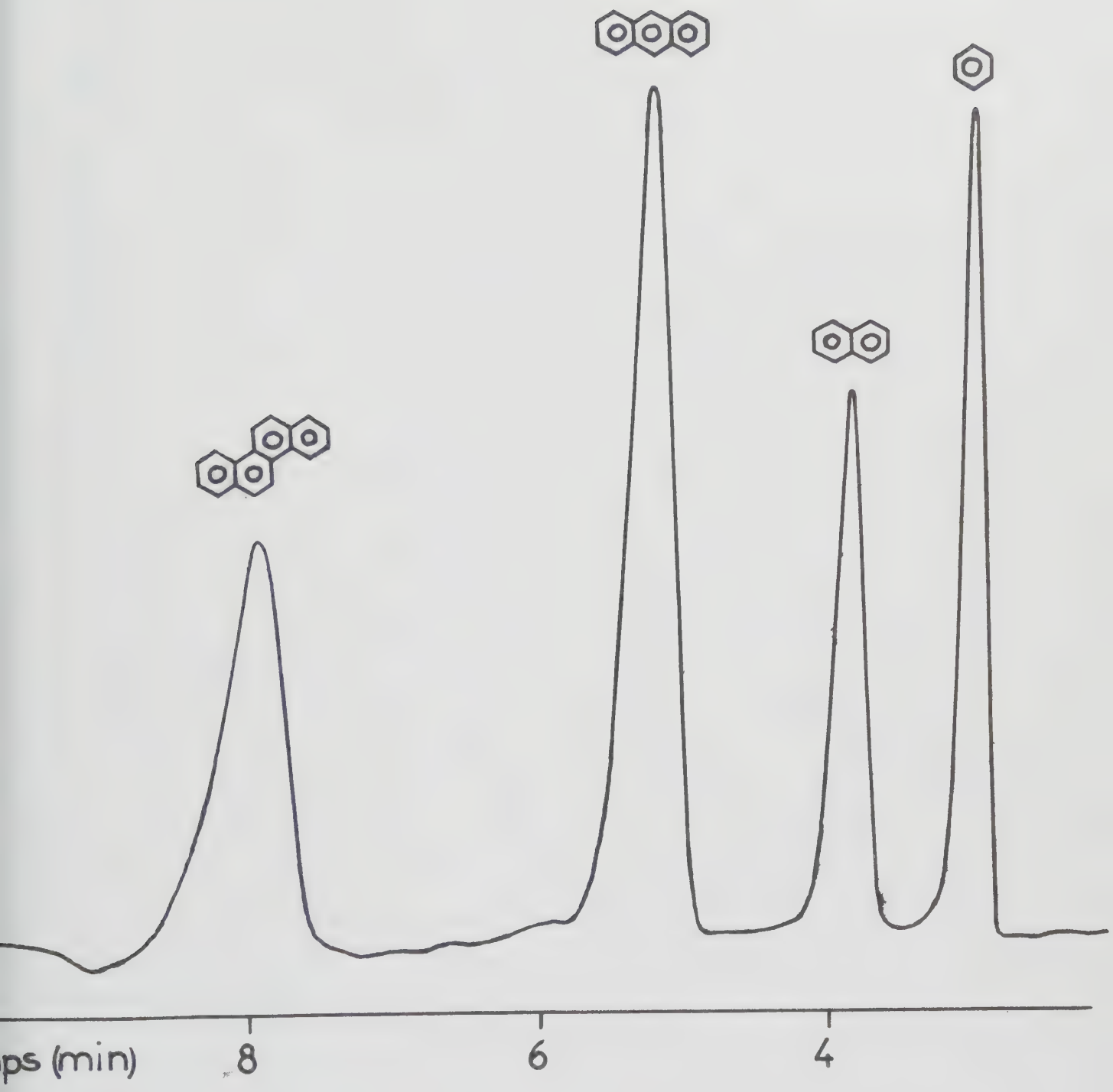


FIGURE 10

Influence de la vitesse d'injection sur la forme des pics : injection lente (5 sec).

Colonne : 12,5 cm x 4,25 mm
Adsorbant : Sphérosil XOA 600 7 µm
Liquide vecteur : n-heptane saturé en eau
$Q = 0,64\ cm^3/mn$
$\Delta P = 22,5$ bars.

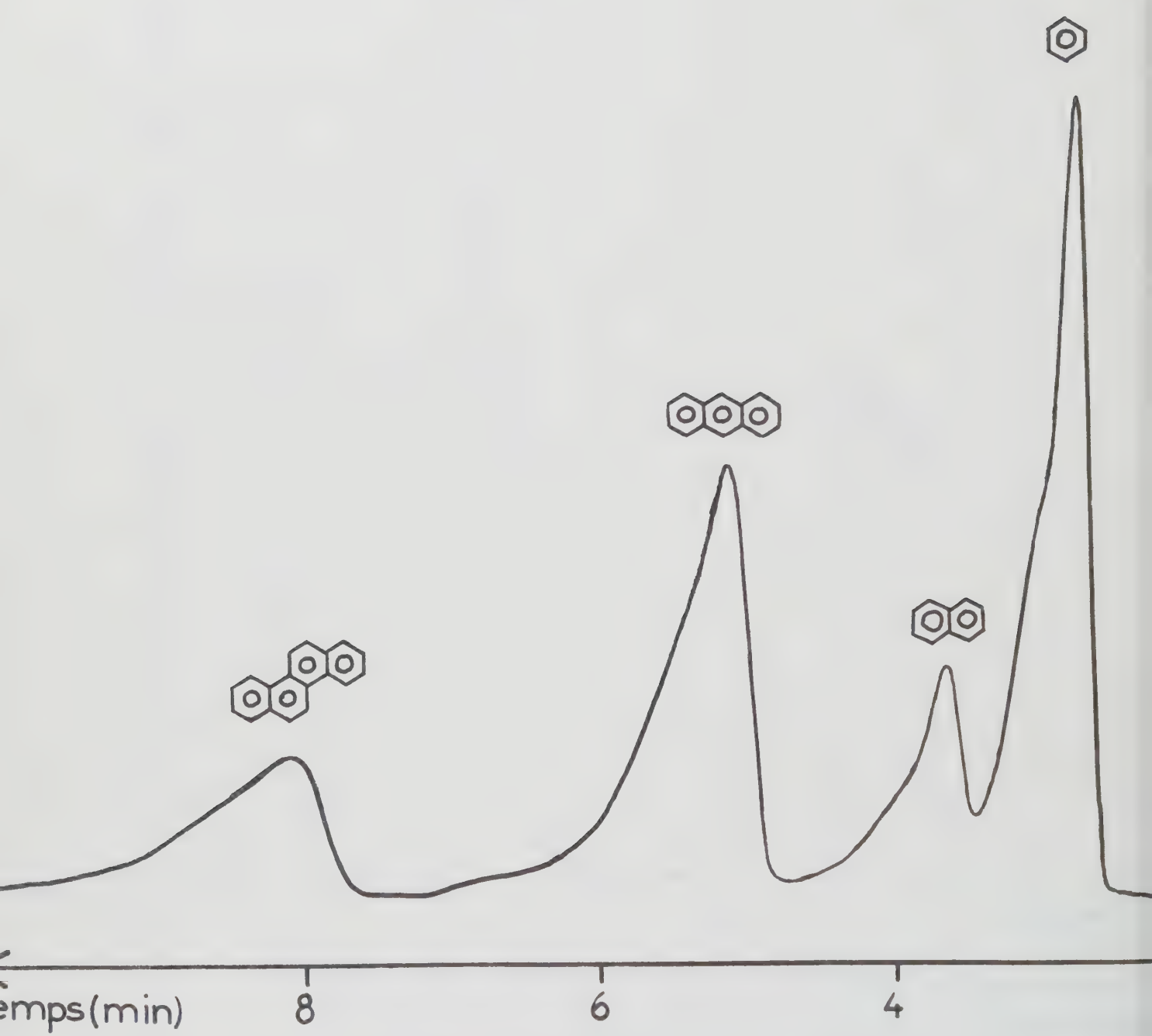


FIGURE 11

Influence de la vitesse d'injection sur la forme des pics : injection instantanée.

Mêmes conditions opératoires que pour la Figure 10.

BIBLIOGRAPHIE - CHAPITRE V

(1) M. MARTIN, G. GUIOCHON, Bull. Soc. Chim. Fr., 1973, 168

(2) H. ENGELHARDT, H. WIEDEMANN, Anal. Chem., 45, 1641 (1973)

(3) G. DEININGER, I. HALASZ, J. Chromatog., 60, 65 (1971)

(4) H. BARTH, E. DALLMEIER, B.L. KARGER, Anal. Chem., 44, 1726 (1972)

(5) J. LOHEAC, M. MARTIN, G. GUIOCHON, Analusis, 1, 263 (1972)

(6) M.J.E. GOLAY, Gas Chromatography 1958, Amsterdam, ed. Desty, Butterworths, Londres, p. 36

(7) W.N. MUSSER, R.E. SPARKS, J. Chrom. Sci., 9, 116 (1971)

(8) J.C. STERNBERG, Advances in Chromatography, ed. J.C. Giddings, R.A. Keller, Marcel Dekker, New-York, 2, 205 (1966)

(9) L.J. SCHMAUCH, Anal. Chem., 31, 225 (1959)

(10) G. McWILLIAM, H.C. BOLTON, Anal. Chem., 41, 1755 (1969)

(11) T. PETITCLERC, G. GUIOCHON, Chromatographia, 7, 10 (1974)

(12) J.J. KIRKLAND, J. Chrom. Sci., 10, 129 (1972)

(13) J.F.K. HUBER, J. Chrom. Sci., 7, 85 (1969)

(14) J.J. KIRKLAND, J. Chrom. Sci., 9, 206 (1971)

(15) R.E. MAJORS, Anal. Chem., 44, 1722 (1972)

(16) F. VERILLON, Résultats non publiés

(17) J.J. KIRKLAND, Gas Chromatography 1972, Montreux, ed. S.G. Perry, Appl. Sci. Publ., p. 39

(18) J. ASSHAUER, I. HALASZ, J. Chrom. Sci., 12, 139 (1974)

ooo o ooo

o o

o

CHAPITRE VI

ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYNUCLEAIRES

Les hydrocarbures aromatiques polynucléaires forment une classe très importante de produits chimiques puisqu'ils constituent une des fractions principales du pétrole et, par conséquent, forment des produits de base de l'industrie chimique. D'autre part, on les retrouve comme polluants de l'atmosphère et de l'eau de mer et certains d'entre eux sont des agents cancérogènes.

Nous n'avons pas cherché à effectuer une étude systématique de séparation de ces composés par chromatographie en phase liquide, d'une part parce que celle-ci est déjà entreprise (1), d'autre part parce que cette technique n'est pas nécessairement la plus appropriée, la chromatographie en phase gazeuse fournissant une excellente résolution, tout au moins pour les plus légers d'entre eux (2). La séparation de ces composés ne représente pas non plus l'exemple le plus frappant d'application de la chromatograhie en phase liquide puisque, en dehors des molécules lourdes, cette méthode est généralement reconnue comme particulièrement bien adaptée aux composés polaires labiles (3, 4).

Cependant, parce qu'ils sont, dans l'ensemble, facilement détectables avec un absorptiomètre U.V. fonctionnant à 254 nm, également parce que leur rétention dans des phases stationnaires polaires, même avec des liquides vecteurs apolaires comme les hydrocarbures aliphatiques, est relativement faible, à cause aussi de leur diversité (composés homologues d'une même famille, c'est-à-dire ayant

.../...

un même squelette aromatique, ou bien dérivés similaires de différentes familles), les hydrocarbures aromatiques polynucléaires se prêtent bien à l'étude de quelques caractéristiques de différentes phases stationnaires, ainsi qu'à l'illustration expérimentale des résultats théoriques.

Dans une première partie, les résultats obtenus en chromatographie d'adsorption sur gel de silice et gel d'alumine seront exposés. Dans la deuxième partie, des séparations effectuées à l'aide d'adsorbants spécifiques, capables de former des complexes par transfert de charge seront montrées. Dans la troisième partie , quelques mots seront dits sur l'utilisation de la chromatographie liquide-liquide. Enfin, dans la dernière, les possibilités offertes par les particules très fines seront illustrées par un chromatogramme. Un certain nombre de séparations qui seront présentées ci-dessous, effectuées au début de ce travail, sont loin de constituer ce que l'on peut appeler des "analyses à haute performance". Néanmoins, les conclusions que l'on peut en tirer en ce qui concerne les caractéristiques de rétention et de sélectivité sont parfaitement applicables aux analyses actuelles.

VI - 1. ADSORPTION SUR GEL DE SILICE ET GEL D'ALUMINE

L'adsorption a été le premier mécanisme de rétention utilisé pour effectuer des séparations chromatographiques. Aujourd'hui encore, ce mode de rétention est considéré, tout au moins apparemment, comme le plus facile à employer puisqu'il permet de travailler à température ambiante et ne nécessite pas, en général, une thermostatation rigoureuse de la colonne.

VI - 1,1. Comparaison des caractéristiques de rétention sur gel d'alumine et gel de silice

Bien qu'étant tous deux des adsorbants polaires, les gels d'alumine et de silice présentent des caractéristiques de rétention assez différentes. Le tableau 2 de l'annexe VI donne les valeurs de k' obtenues pour ces deux supports. D'autres valeurs peuvent être dé-

duites des tableaux 1 et 3 de l'Annexe VII. On peut noter que l'influence d'une chaîne alkyle éventuelle sur la rétention par le gel de silice est importante ; les rétentions relatives par rapport au benzène du toluène, de l'éthylbenzène et du n-butylbenzène sont respectivement 0,90, 0,86 et 0,80. Par contre sur gel d'alumine, l'influence d'une chaîne alkyle sur le coefficient de distribution est très réduite, tout au moins quand le nombre de cycles aromatiques est faible (≤ 3) : le n-dodécylbenzène est à peine moins retenu que le benzène. En outre, l'alumine s'avère beaucoup plus spécifique du système aromatique que le gel de silice et la sélectivité des séparations des hydrocarbures aromatiques devient très importante. Ainsi que le montre la figure A.VI-1, la séparation d'un mélange d'hydrocarbures aromatiques de complexité et d'aromaticité croissantes, est facile.

VI - 1,2. Séparations sur gel d'alumine

Pour toutes ces raisons, le gel d'alumine se prête particulièrement bien à la séparation par familles des hydrocarbures aromatiques. Les figures A.VI-2 et 3 représentent les chromatogrammes obtenus à partir de fractions de distillation lourdes d'effluents de steam-cracking contenant de fortes concentrations de composés aromatiques. Les figures A.VI-1 et 2 montrent une grande similarité, les pics de la seconde figure étant à peine plus larges que ceux de la première, ce qui confirme bien que le gel d'alumine sépare ces mélanges complexes essentiellement en fonction du motif aromatique de la molécule et que les chaînes alkyles éventuelles sont pratiquement sans action. Il est possible de réduire le temps d'analyse en diminuant le diamètre des particules, au prix d'une forte augmentation de la pression d'entrée (voir paragraphe III-2). Ainsi la figure A.VI-6 représente le chromatogramme de la coupe 150 - 350 °C d'un effluent de steam-cracking obtenu sur gel d'alumine 15 - 20 µm en un temps six fois plus court que celui de la figure A.VI-2.

Comme l'indiquent les tableaux A.VI-2, A.VII-1 et A.VII-3, la chromatographie liquide-solide s'avère être une méthode très sélective pour les isomères. Ainsi, la figure A.VI-7 montre la séparation très facile de trois terphényles en moins de dix minutes.

.../...

VI - 1,3. Activité de l'adsorbant

Les valeurs des facteurs de capacité contenues implicitement ou explicitement dans les tableaux A.VI-2, A.VII-1 et A.VII-3 ne doivent pas être considérées comme absolues, mais plutôt comme des indications relatives de la rétention des différents hydrocarbures aromatiques. En effet, comme on l'a déjà noté, la rétention dépend fortement de l'activité de l'adsorbant, contrôlée par sa teneur en eau. Celle-ci doit être en équilibre avec celle du solvant, sinon l'activité de l'adsorbant évolue au cours du temps, parfois d'une manière très lente lorsque la solubilité de l'eau dans le liquide vecteur est très faible, d'où une non-reproductibilité des analyses à moyen ou long terme ; l'ordre d'élution n'est pas modifié, mais la résolution peut l'être fortement (5). C'est d'ailleurs en cela que réside la difficulté d'emploi de la chromatographie d'adsorption. Ainsi, si l'on compare les résultats rassemblés dans les tableaux A.VII-3 et A.VII-5, on remarque des différences notables, excédant largement les erreurs de mesure, entre les valeurs du volume de rétention des hydrocarbures mesurées sur la même colonne (colonne 1) à deux époques différentes et sur une autre colonne (colonne 4) remplie du même acide silicique mais préparée indépendamment de la première. Il faut également noter que tout composé fortement adsorbé modifie l'activité de l'adsorbant (6). On peut remarquer en comparant les figures A.VI-9 et A.VI-8, obtenues dans des conditions opératoires pratiquement identiques, la variation de la rétention de la tétraline provoquée par une injection de 5 µl de thiophène sur la colonne utilisée. Il a d'ailleurs été noté que la rétention pouvait varier d'un facteur supérieur à 100 en modifiant la teneur en eau du chlorure de méthylène (7).

Par ailleurs, l'activité de l'adsorbant influence également la forme des pics, ainsi qu'on peut le voir sur les figures A.VI-8 et A.VI-9. En effet, la surface de l'adsorbant est hétérogène. Elle comporte des sites d'adsorption dont quelques-uns à très forte énergie, qui provoquent une traînée des pics. Lorsqu'ils sont neutralisés par des molécules d'eau, la surface devient plus homogène, ce qui augmente la symétrie des pics, tout en diminuant quelque peu leur rétention.

.../...

VI - 1,4. Séparations sur gel de silice

Pour un même type d'adsorbant, les caractéristiques de rétention peuvent varier d'un support à un autre, ainsi qu'on peut le voir sur le Tableau A.VII-4 qui donne des valeurs de volumes de rétention corrigés ($V_R - V_m$) sur colonnes remplies d'acide silicique et de Sphérosil. Le rapport de ces volumes, qui oscille en moyenne autour de la valeur 3,1 en partie du fait de l'imprécision des mesures, n'est pas égal au produit du rapport des surfaces totales de gel de silice contenu dans les colonnes par le rapport inverse des volumes morts, ce qui prouve que la nature des surfaces des deux adsorbants est différente, le degré d'hydratation jouant sans doute un rôle important. Toutefois, à l'exception de quelques inversions de rétention, qui, en fait, correspondent à une très faible variation du coefficient de distribution, l'ordre d'élution est le même sur les deux surfaces.

La figure A.VII-2 montre la séparation d'un mélange d'hydrocarbures sur un ensemble de deux colonnes reliées en série avec le n-heptane comme liquide vecteur. La séparation est acceptable sauf pour l'acénaphtène qui donne un épaulement au flanc du pic de naphtalène. La figure A.VII-6 donne un autre exemple de séparation de ces composés sur acide silicique.

La séparation des hydrocarbures aromatiques polynucléaires s'effectue donc aussi bien sur gel de silice que sur gel d'alumine, ce dernier ayant l'avantage d'être plus spécifique, mais l'inconvénient de donner des rétentions sensiblement plus importantes.

VI - 1,5. Exemple d'application : mélange de supports

La figure A.VII-6 révèle que certains composés du mélange à analyser sont mal résolus sur gel de silice. Une colonne remplie d'un tiers de gel d'alumine, puis de deux tiers de gel de silice permet d'obtenir,

../..

avec du n-heptane comme liquide vecteur, le chromatogramme de la figure A.VII-7 où tous les composés sont bien séparés, à l'exception du méthyl-pyrène et du pyrène qui forment toujours un épaulement sur le pic de l'anthracène. Cette séparation est obtenue dans le même temps que la précédente, moins satisfaisante. Ces trois derniers composés peuvent être facilement séparés sur une colonne de gel d'alumine ainsi que le montre la figure A.VII-9. La figure A.VII-10 indique un schéma d'appareillage utilisant les deux colonnes avec commutation pour obtenir une analyse complète du mélange. Le couplage de colonnes contenant des remplissages différents a déjà permis l'analyse de mélanges complexes (8,9).

VI - 2. COMPLEXATION PAR TRANSFERT DE CHARGE

Les phases stationnaires susceptibles de former des complexes ont été largement utilisées pour atteindre de très grandes sélectivités en chromatographie gaz-liquide (10). Leur emploi en chromatographie en phase liquide sous pression a eté beaucoup plus restreint jusqu'à présent. Des hétérocycles azotés polynucléaires ont été séparés sur gel de silice imprégné de nitrate d'argent (11). L'acétate de rhodium (II) et le nitrate d'argent ont permis de séparer des composés naturels insaturés tels que les acides gras, les prostaglandines et les triterpènes pentacycliques (12). Enfin, les isomères de la chloroaniline et de la toluidine ont été résolus sur colonne de gel de silice imprégné d'iodure de cadmium (13). De tels adsorbants sélectifs peuvent être employés pour la séparation des hydrocarbures aromatiques polynucléaires.

VI - 2,1. Utilisation du nitrate d'argent

L'ion Ag^+ accepteur d'électrons, est capable de former des complexes par transfert de charge avec les composés insaturés, comme par exemple les oléfines, la constante de formation du complexe étant fortement influencée par des considérations stériques.

.../...

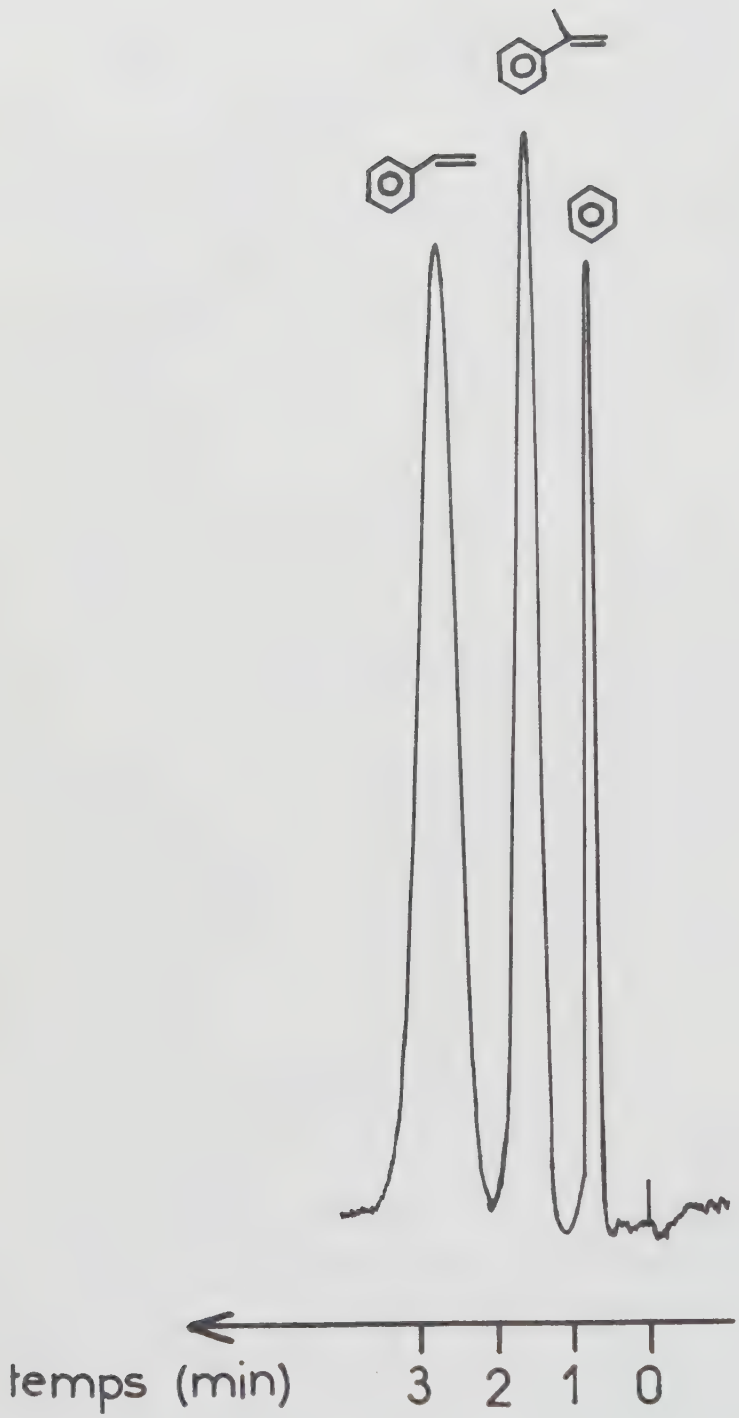
Le gel de silice imprégné de nitrate d'argent est obtenu par un procédé semblable à celui utilisé pour la préparation des phases stationnaires en chromatographie gaz-liquide. Une suspension de gel de silice dans une solution de nitrate d'argent dans l'acétonitrile est placée dans un évaporateur rotatif qui fonctionne jusqu'à évaporation complète du solvant. L'adsorbant ainsi obtenu permet de séparer très aisément les hydrocarbures saturés des insaturés ainsi que les alcènes-1 des alcènes-2, de même que les isomères du pinène (14).

Le nitrate d'argent permet de séparer les dérivés insaturés des hydrocarbures polyaromatiques comme on peut le voir sur la Figure 12 qui montre la séparation du benzène, de l'α-méthyl-styrène et du styrène. Ces deux derniers composés sont très difficilement séparables sur gel de silice. L'ortho et le para-xylène sont partiellement séparés sur nitrate d'argent comme le montre la figure 13. Une résolution complète doit pouvoir être facilement obtenue en diminuant le diamètre des particules ou en augmentant la longueur de la colonne.

VI - 2,2. Utilisation de la trinitrofluorènone

La trinitro-2,4,7-fluorènone ou TNF (point de fusion : 176°C) est un accepteur d'électrons susceptible de former des complexes par transfert de charge avec les hydrocarbures aromatiques polynucléaires. L'imprégnation du gel de silice par la TNF se fait de la même façon que pour le nitrate d'argent en utilisant cette fois-ci l'acétone comme solvant. On a utilisé comme support de la TNF le Corasil I (Waters Associates, Milford, Etats-Unis) qui est un adsorbant pelliculaire constitué d'un noyau imperméable recouvert d'une mince couche de gel de silice poreux. Ce type de particules, de diamètre moyen compris entre 37 et 50 µm , a été utilisé avant l'apparition des très

.../...



.FIGURE 12

Séparation sur nitrate d'argent : benzène, α-méthyl-styrène, styrène.

Colonne : 50 cm x 2,1 mm
Phase stationnaire : acide silicique (Koch-Light Laboratoires) < 43 μm imprégné à 10 % (en poids) de nitrate d'argent.

Liquide vecteur : n-heptane
ΔP = 40 bars; Q = 3 cm^3/min ; T = 54°C

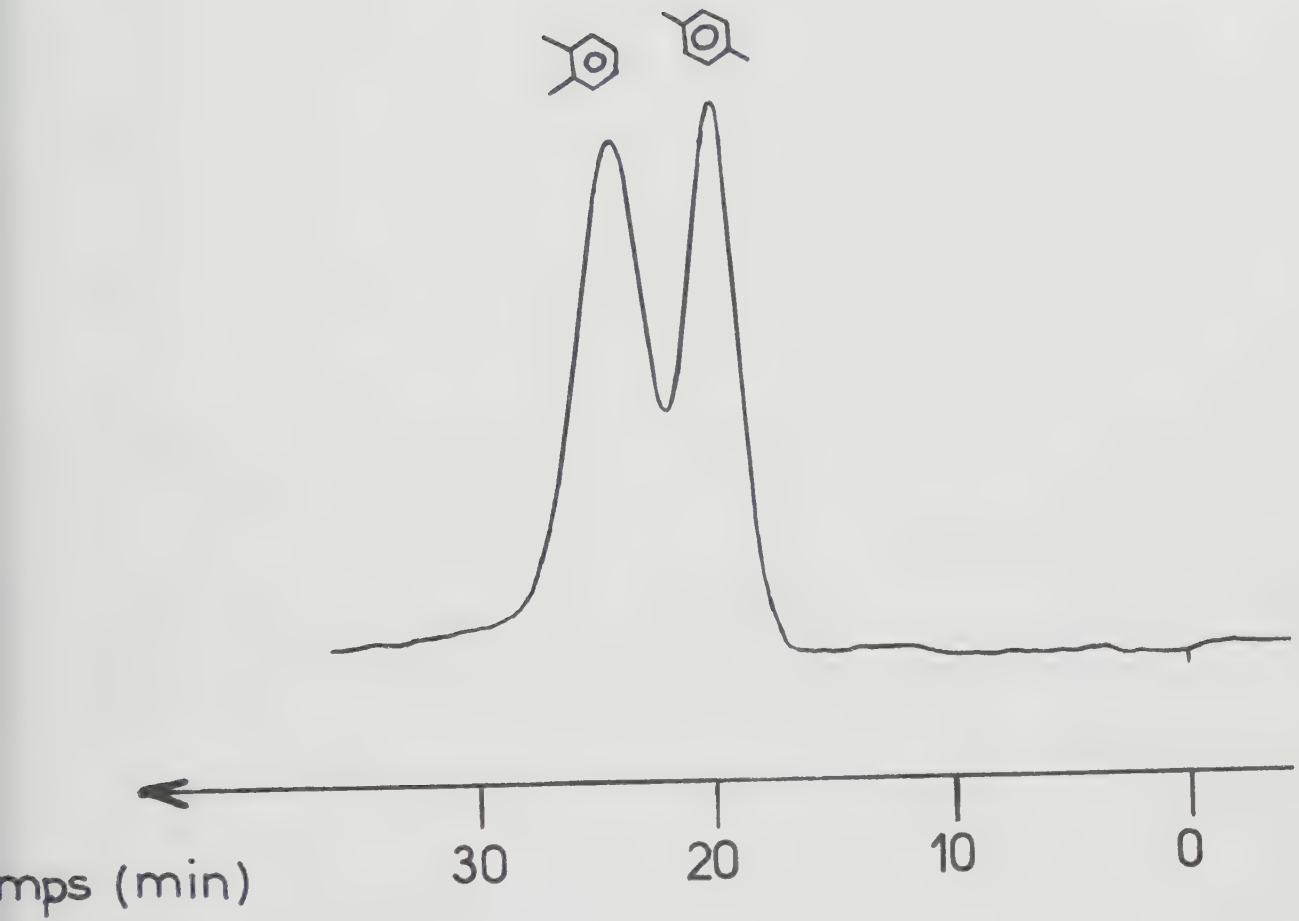


FIGURE 13

Séparation sur nitrate d'argent : para- et ortho-xylènes

Colonne et phases : voir Figure 12

$\Delta P \simeq 2$ bars ; $Q = 0,15$ cm^3/min

$T = 35,5°C$

fines particules pour réduire la résistance au transfert de masse dans le grain et ainsi améliorer l'efficacité.

Dans le Tableau I de l'Annexe VIII, le changement relatif du facteur de capacité de différents hydrocarbures aromatiques polynucléaires provoqué par l'imprégnation du Corasil est indiqué pour différents taux d'imprégnation. Ce changement de rétention, fonction du nombre de noyaux aromatiques condensés, est d'autant plus important que ce nombre est grand et que le taux d'imprégnation est élevé. Toutefois, le changement relatif de rétention n'est pas proportionnel au taux d'imprégnation. Ceci montre que le Corasil I contribue également à la rétention.

Comme l'indique le tableau A.VIII-II,les facteurs de capacité obtenus en utilisant le n-heptane séché sur tamis moléculaire 3A comme liquide vecteur sont bien supérieurs à ceux obtenus avec le n-heptane saturé en eau. Cette variation importante ne peut s'expliquer par le seul changement de la constante de complexation, mais elle doit plutôt être essentiellement attribuée à une modification de l'activité de la surface du Corasil qui participe à la rétention.

L'effet de la température sur la rétention est indiqué sur le tableau A.VIII-III.Le gain d'efficacité obtenu en augmentant la température est contrebalancé par une diminution de rétention. Il en résulte,comme effet net, une perte de résolution.

Compte-tenu de la variation de l'efficacité avec le facteur de capacité (figure A.VIII-1), il existe un domaine optimal de k', compris entre 1 et 5, approximativement, pour effectuer les séparations en un temps relativement court. En ajustant le pourcentage de TNF, la teneur en eau de la phase mobile et la température, on peut ainsi optimiser la colonne pour l'analyse des mélanges d'hydrocarbures aromatiques polynucléaires contenant 3,4,5,6 ou même 7 noyaux

condensés. Ainsi la figure A.VIII-2 montre la séparation de quelques-uns de ces composés à température ambiante sur une colonne imprégnée à 0,06 % de TNF sur Corasil I à l'aide du n-heptane séché. En diminuant la pression, on obtient une séparation complète du benzo-1,2-pyrène et du benzo-3,4-pyrène (figure A.VIII-3). Enfin, en utilisant le n-heptane saturé en eau comme liquide vecteur, le dibenzo-1,2,3,4-pyrène et le dibenzo-3,4,8,9-pyrène sont résolus (figure A.VIII-4).

VI - 3. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

Alors que la chromatographie d'adsorption convient bien pour la séparation de composés de groupes chimiques différents ou ayant un nombre différent de groupements fonctionnels, ou encore pour la séparation des isomères comme on vient de le voir, la chromatographie de partage liquide-liquide s'emploie en général de préférence pour séparer les composés homologues ou les mélanges de constituants différant d'après la longueur des substituants aliphatiques (15,16).

Ainsi la figure 14 représente le chromatogramme d'un mélange partiellement résolu de benzène et de toluène obtenu sur une colonne de Sphérosil 100-125 μm contenant 80 % (en poids) de ββ'-oxydipropionitrile. Ce type de colonne lourdement chargée en phase stationnaire, déjà utilisé en chromatographie en phase liquide (17-21), présente quelques avantages sur les colonnes classiques :

1) la masse d'échantillon que l'on peut injecter est plus importante, ce qui réduit les problèmes de sensibilité de détection et présente un intérêt si l'on désire recueillir le soluté sortant de la colonne;

2) pour une pression donnée, on obtient une vitesse de migration plus grande car la porosité totale diminue;

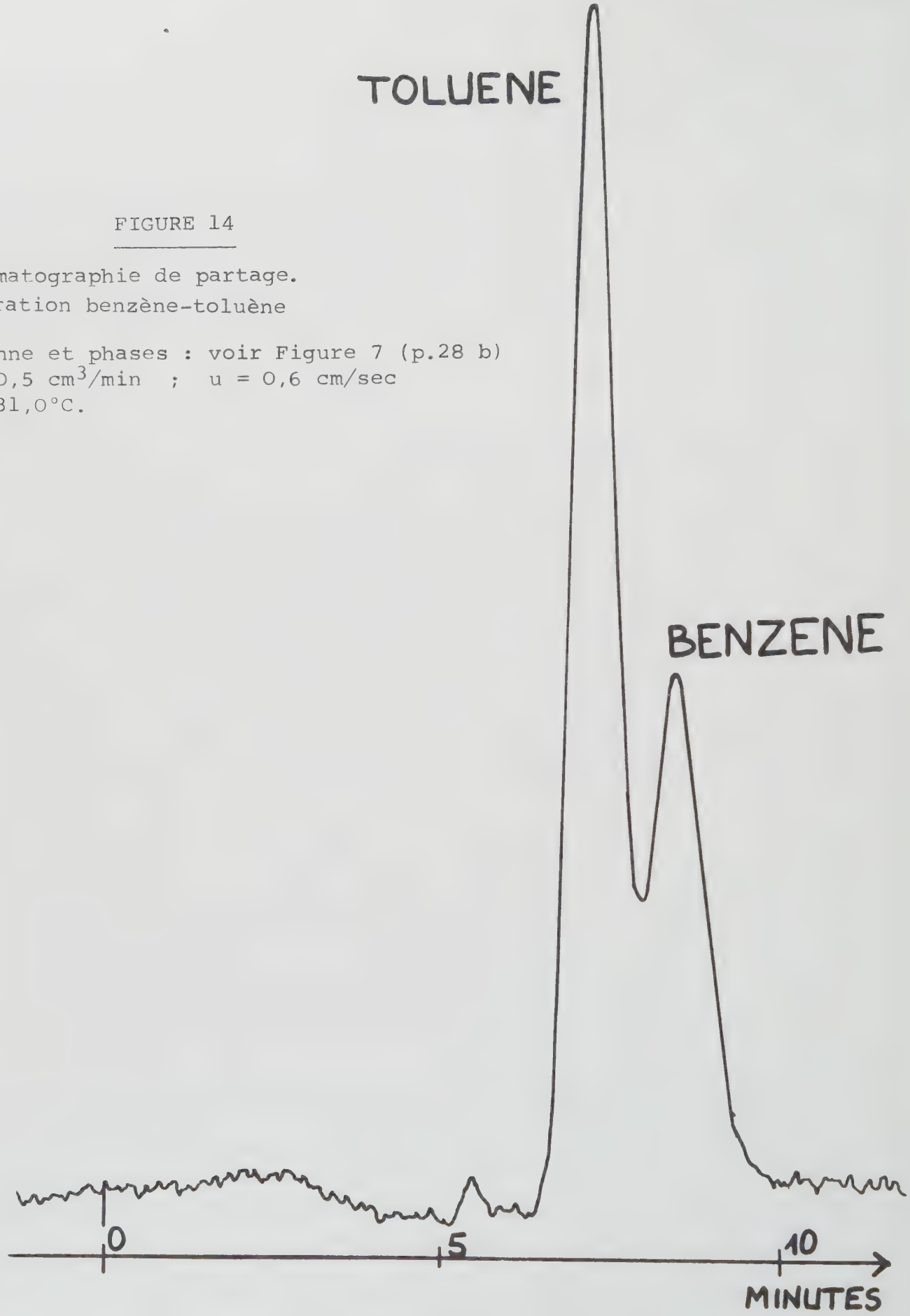
3) la durée de vie de la colonne est plus grande car l'effet d'une perte donnée de phase stationnaire est moins sensible.

.../...

FIGURE 14

Chromatographie de partage.
Séparation benzène-toluène

Colonne et phases : voir Figure 7 (p.28 b)
Q = 0,5 cm^3/min ; u = 0,6 cm/sec
T = 31,0°C.



En chromatographie de partage, en effet, les deux phases liquides doivent être rigoureusement non miscibles, sinon il s'ensuit une modification de la phase stationnaire et donc des caractéristiques de rétention. Cela nécessite d'une part de saturer le liquide vecteur en phase stationnaire au niveau du réservoir, d'autre part d'utiliser une précolonne avant l'injecteur afin d'effectuer un règlage fin de la composition des deux phases. La précolonne doit être thermostatée dans les mêmes conditions que la colonne puisque la solubilité mutuelle est influencée par la température. Ainsi, après défaillance du système de thermostation de la colonne mentionnée ci-dessus, la température est montée de 30°C à 60°C, entraînant une perte de phase stationnaire de la colonne (constatée par une augmentation du volume mort). Les facteurs de capacité de différents solutés ont augmenté , ce qui montre que même pour des colonnes lourdement chargées en phase stationnaire , la surface du gel de silice contribue de façon appréciable à la rétention (19).

VI - 4. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

Les séparations présentées jusqu'à présent, à l'exception peut-être de celle de la figure A.VI-6 ne sont pas particulièrement performantes, si l'on se place du point de vue de l'efficacité et du temps d'analyse. Ceci tient essentiellement à la taille des particules utilisées, en moyenne supérieure à 20 µm.

Une amélioration notable de ces analyses est possible (voir chapitre III) si l'on diminue le diamètre des particules. Ainsi la figure 15 représente le chromatogrammme d'un fraction 150-350°C d'effluents de steam-cracking obtenue par circulation du n-heptane anhydre dans une colonne longue de 6 cm, de 4 mm de diamètre intérieur, remplie de Partisil 5 (granulométrie moyenne environ 5 µm) par la méthode d'équidensité. Cet adsorbant étant une variété de gel de silice, le

.../...

Conditions : voir Figure 5
(page 27 d).

ΔP = 18 bars; Q = 0,85 cm^3/min.

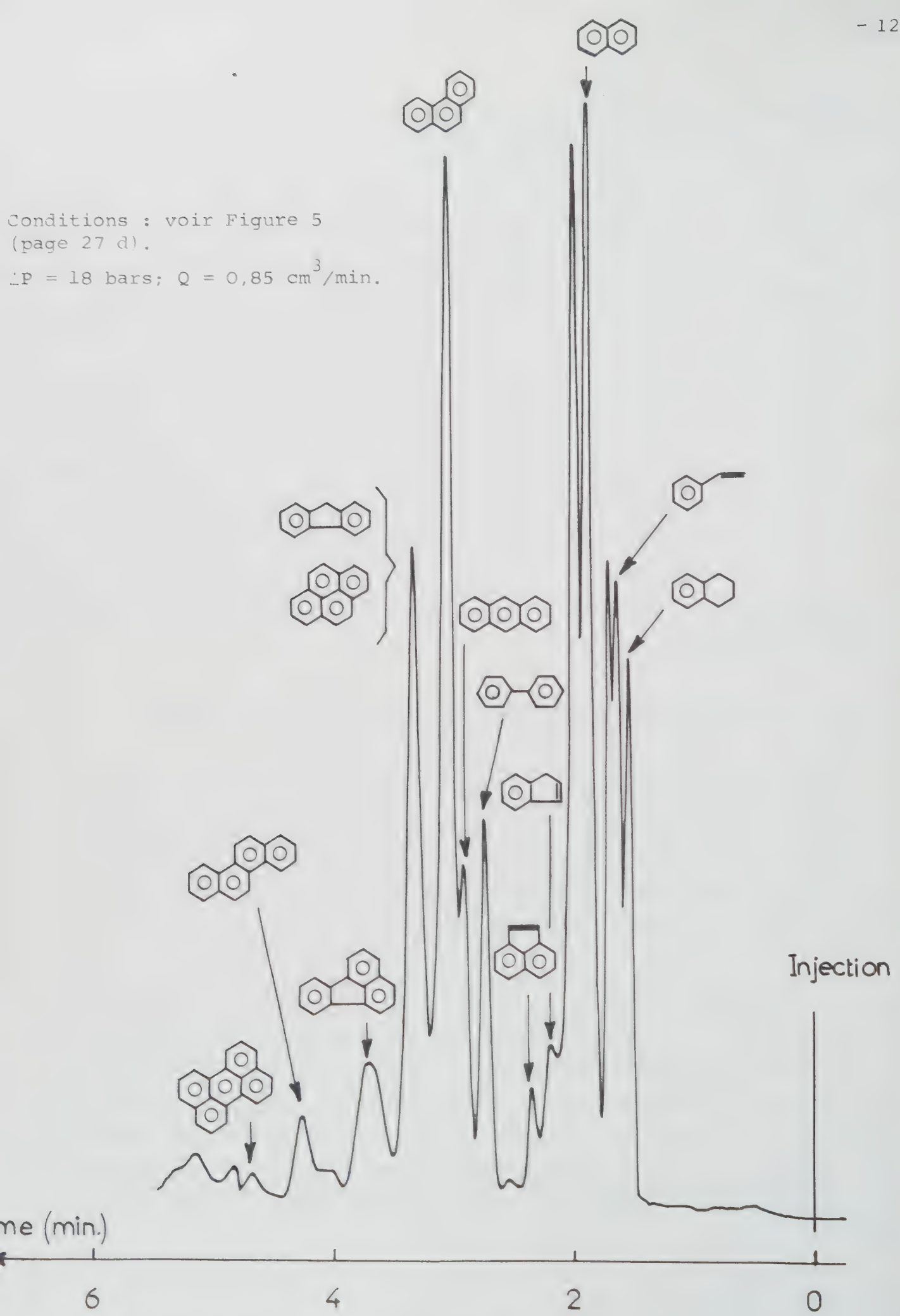


FIGURE 15

Chromatogramme d'effluents de steam cracking (150 - 250° C)

profil du chromatogramme est différent de ceux des figures A.VI-2 et A.VI-6 obtenus sur gel d'alumine. L'analyse, effectuée sous 18 bars de chute de pression au voisinage du minimum de la courbe de HEPT pour la plupart des composants du mélange, permet de distinguer 18 pics en 5 minutes. Par comparaison des volumes de rétention, il est possible de localiser un certain nombre de composés présents dans le mélange sur le chromatogramme.

BIBLIOGRAPHIE - CHAPITRE VI

(1) L.R. SNYDER, Preprints, Div. Petrol. Chem., Am. Chem. Soc., 15, 2, C-44 (1970)

(2) D.L. CAMIN, A.J. RAYMOND, J. Chrom. Sci., 11, 625 (1973)

(3) P.R. BROWN, High Pressure Liquid Chromatography, Biochemical and Biomedical Applications, Academic Press, New-York (1973).

(4) M. MARTIN, G. GUIOCHON, Bull. Soc. Chim. Fr., 1973, 161

(5) L.R. SNYDER, Principles of Adsorption Chromatography, Marcel Dekker, New-York (1968)

(6) R.P.W. SCOTT, J.G. LAWRENCE, J. Chrom. Sci., 7, 65 (1969)

(7) L.V. BERRY, H. ENGELHARDT, J. Chromatog., 95, 27 (1974)

(8) L.R. SNYDER, J. Chrom. Sci.,8, 692 (1970)

(9) C.D. SCOTT, W.W. PITT, J. Chrom. Sci., 10, 740 (1972)

(10) O.K. GUHA, J. JANAK, J. Chromatog., 68, 325 (1972)

(11) R. VIVILECCHIA, M. THIEBAUD, R.W. FREI, J. Chrom. Sci., 10, 411 (1972)

(12) F. MIKES, V. SCHURIG, E. GIL-AV, J. Chromatog., 83, 91 (1973)

(13) D. KUNZRU, R.W. FREI, J. Chrom. Sci., 12, 191 (1974)

(14) J. LOHEAC, Travaux non publiés.

(15) J.F.K. HUBER, F.F.M. KOLDER, J.M. MILLER, Anal. Chem.,44, 105 (1972).

(16) L.R. SNYDER, J.J. KIRKLAND, Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, New-York (1974)

(17) I. HALASZ, H. ENGELHARDT, J. ASSHAUER, B.L. KARGER, Anal. Chem., 42, 1460 (1970)

(18) B.L. KARGER, L.V. BERRY, Clin. Chem., 17, 757 (1971)

(19) H. ENGELHARDT, N. WEIGAND, Anal. Chem., 45, 1149 (1973)

(20) H. ENGELHARDT, J. ASSHAUER, U. NEUE, N. WEIGAND, Anal. Chem., 46, 336 (1974)

(21) G. ROSSLER, I. HALASZ, J. Chromatog., 92, 33 (1974)

CONCLUSION

Parce qu'il a été possible d'augmenter par un facteur 1000 ou 10000 la pression à l'entrée des colonnes et, surtout, de réduire de 20 à 50 fois le diamètre des particules utilisées, la vitesse d'analyse et l'efficacité des séparations en chromatographie en phase liquide sur colonne ont été considérablement améliorées depuis une dizaine d'années. Toutefois, une amélioration sensible de ces performances, à partir du niveau actuel, n'est plus possible, d'une part à cause des difficultés technologiques importantes que présente l'emploi de très hautes pressions (de quelques milliers d'atmosphères), d'autre part parce que la réduction du diamètre des particules augmente très fortement la pression correspondant au minimum de la courbe de HEPT, valeur en dessous de laquelle il n'y a aucun intérêt à travailler. Par ailleurs, la limite ultime des performances de la chromatographie en phase liquide pourrait bien provenir de l'existence de l'effet de température, en particulier, du gradient radial de température qui entraîne une perte d'efficacité. Pour cette raison, il est peu vraisemblable que l'on diminue sensiblement le diamètre des particules en dessous de 2 µm.

En fait, il existe, pour effectuer une analyse déterminée, une pression minimale nécessaire, correspondant au minimum de la courbe de HEPT pour la colonne sur laquelle l'analyse est exécutée. Cette pression est en général beaucoup plus basse que celles généralement utilisées pour les analyses courantes. Alors la colonne est courte et les particules de remplissage sont fines. Dans ces conditions, les effets associés à la pression, qui limitent le modèle simplifié de chromatographie en phase liquide utilisé, tels que les effets de viscosité, de compressibilité, d'écart à la loi de Darcy, de déformation de la colonne et de son remplissage, deviennent négligeables.

.../...

Les conditions que doivent remplir les divers composants d'un chromatographe en phase liquide, pour travailler à cette pression minimale, deviennent plus sévères, particulièrement en ce qui concerne l'injecteur et surtout le détecteur. La plupart des détecteurs actuellement utilisés sont inadaptés aux performances que peuvent fournir les colonnes, tant au point de vue du volume de la cellule que de celui du temps de réponse; par ailleurs, la relativement faible valeur du facteur de réponse limite la capacité de pics (1). Parallèlement, le mode d'injection devra être étudié de façon à réduire la traînée des pics.

Pour toutes ces raisons, il est probable qu'apparaîtront bientôt les chromatographes en phase liquide de la troisième génération, après les appareils classiques et les chromatographes haute pression aujourd'hui conventionnels (2). Ils seront miniaturisés, l'injecteur, la colonne et le détecteur pouvant former un seul bloc spécialement étudié pour limiter les contributions de l'appareillage à l'élargissement des pics, que l'on pourra changer d'une analyse à l'autre.

Dans les conditions actuelles, la chromatographie en phase liquide permet d'atteindre d'excellentes performances. Il est possible aujourd'hui de remplir des colonnes offrant 1000 plateaux théoriques en quelques dizaines de secondes ou bien 100 000 plateaux théoriques en une heure pour un composé ayant un facteur de capacité égal à 2. Avec ces dernières colonnes, on peut d'ailleurs atteindre une très grande capacité de pics, plus de 250 en 5 heures (3), ce qui permet de séparer, avec une résolution de 1, deux composés ayant une rétention relative comprise entre 1,020 (k' = 2) et 1,014 (k' = 14), correspondant à une différence entre les énergies d'adsorption (ou de partage) des deux solutés aussi faible que 10 cal/mole.

Ainsi donc, la chromatographie en phase liquide est devenue aujourd'hui une méthode d'analyse rapide et efficace, complémentaire des autres techniques de séparation, en particulier de la chromatographie en phase gazeuse, convenant particulièrement bien là où cette dernière

.../...

méthode est limitée, c'est-à-dire pour l'analyse des produits thermodégradables (en général relativement polaires) ou peu volatils (molécules lourdes). Cependant, le développement de la chromatographie en phase liquide nécessite un effort considérable pour comprendre les mécanismes de rétention et prévoir le meilleur système de phases adapté à la séparation d'un mélange donné parmi tout l'éventail des possibilités actuelles : adsorption sur gel de silice ou gel d'alumine, ou encore sur noir de carbone; partage; échange d'ions; perméation de gel, même pour des substances à faible poids moléculaire (4); rétention sur phases chimiquement liées à un support rigide (5); complexation par transfert de charge; formation de paires d'ions (6-8); voire même affinité (9).

BIBLIOGRAPHIE - CONCLUSION

(1) R.P.W. SCOTT, J. Chrom. Sci., 9, 449 (1971)

(2) New trends in the design of liquid chromatographs or the equipments of the third generation.
M. MARTIN, C. EON, G. GUIOCHON, Research and Development, (à paraître).

(3) E. GRUSHKA, Anal. Chem., 42, 1142 (1970)

(4) R.V. VIVILECCHIA, R.L. COTTER, R.J. LIMPERT, N.Z. THIMOT, J.N. LITTLE, J. Chromatog., 99, 407 (1974)

(5) D.C. LOCKE, J. Chrom. Sci., 11, 120 (1973)

(6) S. EKSBORG, P.-O. LAGERSTROM, R. MODIN, G. SCHILL, J. Chromatog., 83, 99 (1973)

(7) B.-A. PERSSON, B.L. KARGER, J. Chrom. Sci., 12, 521 (1974)

(8) J.C. KRAAK, J.F.K. HUBER, J. Chromatog., 102, 333 (1974)

(9) J. TURKOVA, J. Chromatog., 91, 267 (1974)

- LISTE DES SYMBOLES -

a	Coefficient de l'équation V-12
d	Distance caractéristique du liquide stationnaire
d_c	Diamètre intérieur de la colonne
d_l	Densité du liquide stationnaire
d_p	Diamètre moyen des particules
$d_{p\ opt}$	Diamètre moyen des particules permettant d'effectuer une analyse avec un minimum de pression.
d_s	Densité vraie du support
h	Hauteur équivalente à un plateau théorique réduite
	Hauteur hypothétique du pic (éq. V-13)
h_{min}	Valeur minimale de h
j	Facteur de compressibilité
k	Perméabilité de la colonne (éq. I-13)
	Coefficient de dissipation de la chaleur (eq. II-9)
	Coefficient de proportionnalité de l'équation V-12
k_o	Coefficient de perméabilité (sans dimension)
k'	Facteur de capacité
$k^{\neq}$	Coefficient de rétention lié à k' d'après l'équation I-50
l	Longueur des tubes de connexion
m	Masse de soluté injectée dans la colonne
m_D	Masse minimale de soluté devant être injectée pour permettre la détection à l'aide d'un détecteur sensible à la concentration.
m'_D	Masse minimale de soluté devant être injectée pour permettre la détection à l'aide d'un détecteur sensible au débit massique.
m_l	Masse de liquide stationnaire contenu dans la colonne
m_S	Masse de support contenu dans la colonne
n	Exposant de u dans l'équation I-52
p_i	Pression d'entrée dans la colonne

.../...

p_o	Pression de sortie de la colonne
q	Facteur de configuration de la phase stationnaire
r	Rayon interne des tubes de connexion
t_d	Temps de désorption moyen
t_m	Temps de séjour moyen d'une molécule de liquide vecteur dans la colonne.
t_o	Temps de séjour moyen dans la colonne d'une molécule de liquide idéal
$t_{o,max}$	Temps maximal tolérable d'injection
t_R	Temps de rétention
u	Vitesse de filtration = vitesse moyenne de transit d'une molécule de liquide vecteur dans la colonne
u'	Vitesse moyenne de transit d'une molécule de soluté dans la colonne
u_{tc}	Vitesse linéaire du liquide dans les tubes de connexion
v	Vitesse en fût vide du liquide vecteur dans la colonne
$\bar{v}$	Vitesse superficielle du liquide vecteur
y	Réponse du détecteur
A	Coefficient des équations I-51 et I-55
A_{MC}	Equivalent de H_{MC}
A_S	Aire de la surface du solide en contact avec le liquide
B	Coefficient de proportionnalité dans l'expression de H_D
C	Coefficient des équations I-51 et I-55
	Concentration du soluté (éq.V-12)
C_{max}	Conc. du soluté au maximum du pic
C_{MD}	Facteur de proportionnalité dans l'expression de H_{MD}
C_o	Concentration du soluté dans l'échantillon injecté
C_p	Capacité calorifique du liquide à pression constante
C_S	Facteur de proportionnalité dans l'expression de H_S
C_{SM}	Facteur de proportionnalité dans l'expression H_{SM}
C_V	Capacité calorifique du liquide à volume constant
$(C_o/C_{max})_{opt}$	Dilution obtenue en travaillant au minimum de h

.../...

D	Coefficient de l'équation I-52
D_m	Coefficient de diffusion du soluté en phase mobile
D_p	Coefficient de diffusion effectif du soluté dans le grain
D_S	Coefficient de diffusion du soluté en phase stationnaire.
G	Niveau de bruit de fond d'un détecteur
H	Hauteur équivalente à un plateau théorique
H_D	Contribution de la diffusion longitudinale à H
H_M	Contribution des inégalités de vitesses en phase mobile à H.
H_{MC}	Contribution à H_M due à la convection
H_{MD}	Contribution à H_M due à la diffusion
H_R	Contribution des résistances aux transferts de masse à H
H_S	Contribution de la résistance au transfert de masse en phase stationnaire à H
H_{SM}	Contribution de la résistance au transfert de masse en phase stagnante à H
K	Constante d'équilibre de partage ou d'adsorption
K^*	Facteur caractéristique de l'injection (eq.IV-11)
L	Longueur de la colonne
L_{opt}	Longueur de la colonne permettant d'effectuer une analyse avec un minimum de pression.
N	Nombre de plateaux théoriques.
P_e	Nombre de PECLET
Q	Débit du liquide vecteur
R	Facteur de rétention
R_S	Résolution
S	Aire de la section droite de la colonne. Sensibilité d'un détecteur sensible à la concentration (Eq. IV-1)
S'	Sensibilité d'un détecteur sensible au débit massique.
S_c	Nombre de SCHMIDT
T	Température
T_o	Température ambiante
V_{col}	Volume total de la colonne

V_{det}	Volume de la cellule du détecteur
$V_{det,max}$	Volume maximal tolérable de la cellule du détecteur
V_e	Volume occupé par le liquide vecteur à l'extérieur des grains.
V_i	Volume occupé par le liquide vecteur stagnant dans les pores.
V_l	Volume occupé par le liquide stationnaire dans la colonne.
V_m	Volume mort de la colonne
V_o	Volume mort de la colonne pour un liquide idéal (Chap.II)
	Volume d'échantillon injecté (Chap.IV et V)
$V_{o,max}$	Volume maximal tolérable d'échantillon injectable
V_p	"Volume poreux", volume occupé par les pores internes d'un gramme de solide
V_R	Volume de rétention
V_S	Volume occupé par le solide dans la colonne
α	Facteur de sélectivité (éq. I-37)
	Coefficient de variation de la viscosité avec la pression (éq.II-6)
β	Exposant de d_p dans l'équation III-4
γ	Facteur d'obstruction de l'espace intergranulaire (éq.I-40). Coefficient de proportionnalité dans l'expression de H (Eq. III-4).
γ_{SM}	Facteur de tortuosité à l'intérieur de la particule
ϵ_e	Porosité externe
ϵ_i	Porosité interne
ϵ_{tot}	Porosité totale
η	Viscosité dynamique du liquide vecteur
η_o	Viscosité du liquide à pression atmosphérique
ϑ^2	Perte relative d'efficacité tolérée.
λ	Facteur de correction sans dimension (éq.I-45)
	Multiple arbitraire du bruit de fond (éq.IV-1 et IV-3)
λ_1, λ_2	Coefficient de proportionnalité (éq.I-49)

.../...

ν	Vitesse réduite
ν_{opt}	Valeur de ν correspondant au minimum de h (éq.I-55)
ρ	Masse volumique de la phase mobile
σ^2	Variance du soluté
σ^2_{col}	Contribution de la colonne à la variance du soluté
σ^2_{ext}	Contribution des zones externes à la colonne à la variance du soluté.
σ^2_L	Variance du soluté exprimée en unité de longueur de colonne.
σ^2_t	Variance du soluté exprimée en unité de temps.
σ^2_{tot}	Variance totale du soluté
σ^2_v	Variance du soluté exprimée en unité de volume
$\sigma^2_{v,det}$	Contribution du volume de la cellule du détecteur à la variance volumique du soluté.
$\sigma^2_{v,inj}$	Contribution de l'injection à la variance volumique du soluté.
$\sigma^2_{v,tc}$	Contribution des tubes de connexion à la variance volumique du soluté.
τ_{max}	Valeur maximale tolérable de la constante de temps du détecteur.
χ	Facteur de tortuosité de l'espace intergranulaire (éq.I-49). Coefficient de compressibilité du liquide.
χ_o	Coefficient de compressibilité du liquide indépendant de la pression.
Ψ_f, Ψ_b	Facteurs de configuration (éq.I-49)
ω	Facteur de correction sans dimension (éq.I-45 et I-46)
ΔG	Variation d'enthalpie libre molaire du soluté au cours de la rétention.
ΔN	Perte du nombre de plateaux théoriques (éq.V-13)
ΔP	Différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne.

.../...

ΔP_{min} Valeur minimale de ΔP permettant d'effectuer une analyse donnée.

ΔS Variation d'entropie molaire du soluté au cours de la rétention.

ΔT Différence de température entre l'entrée et la sortie de la colonne.

ΔV Variation de volume molaire du soluté au cours de la rétention.

$\emptyset$ Rapport de la porosité interne à la porosité externe.